

DIE BINDUNG VON PYRIDINDERIVATEN
AN TEILGEREINIGTES CYTOCHROM P 450

WOLFGANG SCHNEIDER

1976



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547917_0026

Aus dem Pharmakologischen Institut der Johannes
Gutenberg-Universität Mainz

DIE BINDUNG VON PYRIDINDERIVATEN AN TEIL-
GEREINIGTES CYTOCHROM P450



Inauguraldissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der Medizin der
Johannes Gutenberg-Universität Mainz,
den Medizinischen Fachbereichen

vorgelegt von
Wolfgang Schneider
aus Niederbrombach

Mainz 1975

Gesamtherstellung



DITTERS BÜRODIENST

6501 HEIDESHEIM/RHEIN

AM KAPELLECHEN 1 · RUF 06132/57 11



Fachbereichsdekan: Professor Dr. P. Klein

Referent: Professor Dr. G.F. Kahl

Korreferent: Professor Dr. K.J. Netter

Tag der mündlichen Prüfung: 20.10.1976

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1. EINLEITUNG	1
1.1. Grundzüge des Arzneimittelstoffwechsels	1
1.2. Die Reinigung der Komponenten des arznei- mittelabbauenden Enzymsystems	2
1.3. Die Bedeutung des Phospholipids im mikro- somalen Arzneimittelstoffwechsel	6
1.4. Rekonstituiertes System	7
1.5. Induktion und Spezifität des arznei- mittelabbauenden Systems	9
1.6. Elektronenresonanzuntersuchungen	11
1.7. Differenzspektren	12
1.8. Molekulare Eigenschaften des Cytochrom P450	13
1.9. Absolutspektren	16
2. ZIEL DER ARBEIT	18
3. METHODEN	20
3.1. Gewinnung der Mikrosomenfraktion	20
3.2. Partielle Reinigung von Cytochrom P450	21
3.3. Meßverfahren	25
3.3.1. Spektralanalytische Untersuchungstechnik	25
3.3.2. Spezielle Meßmethoden	26
3.4. Chemikalien	29
4. ERGEBNISSE	30
4.1. Reinigungserfolg	30
4.1.1. Quantitative Auswertung	30
4.1.2. Qualitative Auswertung	35
4.2. Substratbindung an teilgereinigtes oxidiertes Cytochrom P450	38
4.2.1. Qualitative Befunde	38
4.2.2. Quantitative Befunde	40
4.3. Substratbindung an reduziertes Cytochrom P450	43
4.3.1. Die Bindung von Metyrapon und Pyridin an teilgereinigtes Cytochrom P450 nach PB- Vorbehandlung	43
4.3.2. Die Entstehung der Soretregion	45
4.3.3. Alterung eines MP-Differenzspektrums	47
4.3.4. Spektrale Dissoziationskonstante (K_s)	49
5. DISKUSSION	51
6. ZUSAMMENFASSUNG	62
7. LITERATURVERZEICHNIS	64

1. EINLEITUNG

1.1. Grundzüge des Arzneimittelstoffwechsels

Für den Stoffwechsel vieler lipophiler Fremdsubstanzen (Arzneimittel, Karzinogene) und körpereigener Stoffe (Steroidhormone, Fettsäuren) ist ein Enzymsystem verantwortlich, dessen wichtigster funktioneller Bestandteil, ein Hämoprotein vom b-Typ, als "CO-bindendes Pigment" in den Mikrosomen der Leber entdeckt wurde (KLINGENBERG, 1958; GARFINKEL, 1958). In höheren Organismen befindet sich dieses Pigment außerdem in membrangebundener Form in den Mikrosomen der Niere (ELLIN et al., 1972), der Nebennierenrinde (ESTABROOK et al., 1963), der Darmmukosa (TAKESUE und

Verzeichnis der in dieser Arbeit verwendeten Abkürzungen:

ΔA	= Differenz der spektralen Absorption
CO	= Kohlenmonoxid
DOCh	= Desoxycholat
DTT	= Dithiothreitol
EDTA	= Äthylendiamintetraacetat
FAD	= Flavinadenindinucleotid
g	= Erdbeschleunigung (9,81 m/sec ²)
HB	= Hexobarbital
KO	= Kontrolle
K _s	= Substratkonstante, spektrale Dissoziationskonstante
M	= Konzentration in Mol/Liter
MC	= 3-Methylcholanthren
MG	= Molekulargewicht
MP	= Metyrapon
N	= Konzentration in Val/Liter
NaCh	= Natriumcholat
NAD(H)	= Nicotinamidadenindinucleotid (reduziert)
NADP(H)	= Nicotinamidadenindinucleotidphosphat (reduziert)
PB	= Phenobarbital

SATO, 1968) und in den Mitochondrien mehrerer endokriner Drüsen (HARDING et al., 1964; YORO und HORIE, 1967). Auch in Hefepilzen ist das Hämoprotein an zelluläre Strukturen assoziiert (LINDENMAYER und SMITH, 1964; ISHIDATE et al., 1969). Einige Mikroorganismen besitzen das Pigment in löslicher Form: *Pseudomonas putida* (HEEDEGARD und GUNSALUS, 1965) und *Rhizobium japonicum* (APPLEBY, 1967).

Die von diesem Enzym katalysierten oxidativen Prozesse benötigen molekularen Sauerstoff und NADPH (AXELROD, 1955; MITOMA et al., 1956; GILLETTE et al., 1957; LA DU et al., 1955). Das molekulare Geschehen entspricht dabei dem Prinzip der mischfunktionellen Oxidation (mixed function oxidation) (MASON, 1957). Die Bindung von Kohlenmonoxid an das reduzierte Pigment führt zu einer starken Lichtabsorption bei 450 nm (ESTABROOK et al., 1963). Aufgrund dieser besonderen spektralen Eigenschaft erhielt das Pigment den Namen "Cytochrom P-450" (OMURA und SATO, 1962). Im enzymatischen Geschehen erfüllt Cytochrom P450 eine Doppelfunktion, da es sowohl als Endoxidase die O_2 -Bindung übernimmt (COOPER et al., 1965; OMURA et al., 1965), als auch für die Substratbindung verantwortlich ist (IMAI und SATO, 1966 a; REMMER et al., 1966).

Außer Cytochrom P450 enthalten die Enzymsysteme noch Cytochrom b_5 (STRITTMATTER und BALL, 1954) und das ihm vorgeschaltete Flavoprotein NADH-Cytochrom b_5 -Reduktase (STRITTMATTER, 1958).

In die Elektronentransportkette zwischen NADPH und Cytochrom P450 ist die NADPH-Cytochrom c-Reduktase, ebenfalls ein Flavoprotein, eingeschaltet (COON und LU, 1969).

1.2. Die Reinigung der Komponenten des arzneimittelabbauenden Enzymsystems

Aufschluß über die Bedeutung der einzelnen Komponenten des arzneimittelabbauenden Enzymsystems blieb der Isolation der einzelnen Bestandteile vorbehalten. Insbesondere galt es die Frage zu klären, inwieweit die Einzelbausteine für die Enzymaktivität essentiell sind, wie die molekularen Eigen-

schaften der Cytochrome, Reduktasen und Lipide sind und wie verschiedene Fremdstoffe auf die verschiedenen Untereinheiten wirken.

1.2.1. NADPH-Cytochrom c-Reduktase

Die NADPH-Cytochrom c-Reduktase konnte durch proteolytische Digestion des Ausgangsmaterials solubilisiert und isoliert werden (HORECKER, 1950; PHILLIPS und LANGDON, 1962; NISHIBAYASHI et al., 1963). Auch eine Butanolextraktion von Lebermikrosomen erwies sich als geeignet, das Enzym zu solubilisieren (WILLIAMS und KAMIN, 1962). Schließlich war es möglich, die Reduktase zusammen mit den übrigen relevanten Enzymen durch die Einwirkung eines Detergens von den mikrosomalen Membranen abzulösen und chromatographisch darzustellen (LU et al., 1969 a; LU et al., 1972 b; LEVIN et al., 1974).

1.2.2. NADH-Cytochrom b₅-Reduktase

Zur Reinigung der NADH-Cytochrom b₅-Reduktase wurden zunächst ebenfalls proteolytische Methoden verwandt (STRITTMATTER und VELICK, 1957; SARGENT et al., 1970; STRITTMATTER et al., 1972; TAKESUE und OMURA, 1970). Das MG des hydrolytisch gewonnenen Proteins wurde mit 38 400 - 42 000 (STRITTMATTER und VELICK, 1957), 35 000 (STRITTMATTER, 1971) und 34 000 (STRITTMATTER et al., 1972) angegeben. Als Flavinkomponente dieses Enzyms wurde FAD beschrieben (STRITTMATTER und VELICK, 1957; STRITTMATTER et al., 1972). Neuere Arbeiten konnten die b₅-Reduktase auch mit Detergentien solubilisieren und anschließend chromatographisch darstellen (MIHARA und SATO, 1972; SPATZ und STRITTMATTER, 1973). Das MG wurde mit 43 000 angegeben, als Ausdruck dafür, daß das gewonnene Enzym, im Gegensatz zu den proteolytisch erhaltenen Proteinen, auch das hydrophobe, membranbindende Segment enthielt (SPATZ und STRITTMATTER, 1973).

1.2.3. Cytochrom b_5

Neben den beiden Flavoproteinen wird durch verschiedene Proteasen auch Cytochrom b_5 weitgehend solubilisiert (MURRIMAPPER und VELICK, 1956; ITO und SATO, 1969; MITANI et al., 1971; COMAI und GAYLOR, 1973). Aus diesem Grund erwies sich die proteolytische Methode auch geeignet, Cytochrom b_5 vom Cytochrom P450 zu trennen, das auf diese Weise nur unwesentlich solubilisiert wird (ITO und SATO, 1969). Die ersten Versuche mit Trypsin (NISHIBAYASHI und SATO, 1968) und Steapsin (OMURA und SATO, 1963) führten zu einer weitgehenden Konversion von Cytochrom P450 in die inaktive Form P420 (OMURA und SATO, 1962), die löslich ist und unter Einwirkung proteolytischer Enzyme, oberflächenaktiver Substanzen und Schwermetallen entsteht (OMURA und SATO, 1962; IMAI und SATO, 1967). Eine Rekonversion in die aktive Form konnte durch Polyole und Glutathion erreicht werden (ICHIKAWA und YAMANO, 1967 b). Durch Verwendung der Bacillus subtilis-Protease "Nagarse" zur Trennung der beiden Cytochrome konnte eine Konversion in Cytochrom P420 verhindert werden (NISHIBAYASHI und SATO, 1968).

Auch Detergentien erwiesen sich als geeignet, Cytochrom b_5 zu solubilisieren (ITO und SATO, 1968; OZOLS, 1974). Eine Kombination von proteolytischer Digestion mit einer Detergensbehandlung wurde von OZOLS (1972) beschrieben. Die Aminosäuresequenz von Cytochrom b_5 konnte nach proteolytischer Digestion (OZOLS, 1970) und nach Detergenssolubilisierung (OZOLS, 1974) weitgehend aufgeklärt werden.

1.2.4. Cytochrom P450

Die Solubilisierung von Cytochrom P450 erwies sich wegen der starken Membranbindung des Cytochroms im Säugetiergewebe als problematisch. Demgegenüber konnte das Enzym schon leicht *in situ* aus *Pseudomonas putida* in gereinigter Form gewonnen werden (KATAGIRI et al., 1968; YU und GUNSALUS, 1970; CUSHMAN et al., 1967). Das von Yu und GUNSALUS (1970) gereinigte Cytochrom P450 besaß kristalline Reinheit.

Eine erfolgreiche Solubilisierung von membrangebundenem Cytochrom P450 konnte mittels verschiedener Detergentien erreicht werden. Über den molekularen Wirkungsmechanismus der verschiedenen Detergentien liegen eingehende Untersuchungen vor (GREEN und PERDUE, 1966; BONT et al., 1969; BLEECKER et al., 1973; MITANI et al., 1971; MIYAKE et al., 1968; DENK et al., 1971).

Die erste Beschreibung der Solubilisierung des mikrosomalen Cytochrom P450 zusammen mit Cytochrom b_5 durch DOCh gaben OMURA und SATO (1962). Allerdings führte diese Behandlung die Endoxidase vollständig in Cytochrom P420 über. Auch die Anwendung von Tertamylalkohol, KCl und Cholsäure zur Solubilisierung des mikrosomalen Cytochrom P450 blieb wegen der exzessiven Bildung von Cytochrom P420 und des Verlustes der hydroxylierenden Aktivität zunächst erfolglos (MacLENNAN et al., 1967). LU und COON (1968) konnten Cytochrom P450 mit DOCh solubilisieren. Eine anschließende Säulenchromatographie trennte eine hitzestabile Fraktion von einer hitze-labilen, in welcher Cytochrom P450 und die NADPH-Cytochrom c-Reduktase nachgewiesen wurden. LU et al. (1969 a) trennten das mikrosomale Enzymsystem nach DOCh-Solubilisierung und DEAE-Cellulosechromatographie in eine reduktasehaltige Fraktion, eine Cytochrom P450-haltige Fraktion und eine Lipidkomponente. Als Weiterentwicklung dieser Methode wurden eine Beschallung der Mikrosomensuspension und eine graduelle Ammoniumsulfatfällung des DOCh-behandelten Ansatzes beschrieben (LU et al., 1971). Durch eine Verbesserung dieses Verfahrens, besonders hinsichtlich der Aussalzungsschritte, konnte Cytochrom P450 gegenüber den Mikrosomen um mehr als das Doppelte angereichert werden (LU und LEVIN, 1972). Grundsätzlich wurde diese Methode auch zur partiellen Reinigung von Cytochrom P450 aus menschlichen Plazentarmikrosomen benutzt (SYMMS und JUCHAU, 1973). DUPPEL et al. (1973) benutzten den Pilz *Candida tropicalis* (LM ?) als P450-Quelle. Durch Cholsolubilisierung und Ammoniumsulfatfraktionierung konnte die Endoxidase fünffach angereichert werden und eine Kontamination mit Fremdenzymen und funktionellem Lipid weit-

gehend vermieden werden. Die Behandlung mit Cholat und die anschließende Aussalzung mit Ammoniumsulfat erwies sich auch als geeignet, Cytochrom P450 aus Mitochondrien der Nebennierenrinde zu reinigen (SHIKITA et al., 1973). BALLOU et al. (1974) beschrieben eine Methode zur Reinigung von Cytochrom P450, bei der die Mikrosomen zunächst mit Polyäthylenglycol präzipitiert werden. Die Endoxidase wird darauf mit Cholat solubilisiert und durch Ammoniumsulfatfraktionierung gereinigt. Einige Autoren verwendeten zur Solubilisierung nichtionische Detergentien: Lubrol WX (MIYAKE et al., 1968), Triton N-101 (FUJITA und MANNERING, 1971; SCHLEYER et al., 1972), Triton X-100 (ICHIHARA et al., 1970, 1971) und Emalgen 911 (SATO et al., 1973).

Eine Kombination von proteolytischer Behandlung zur weitgehenden Solubilisierung von Cytochrom b_5 mit einer Detergentienbehandlung zur Ablösung von Cytochrom P450 von den Membranen wurde von MIFANI et al. (1971) und von COMAI und GAYLOR (1973) beschrieben. Durch kombinierte Anwendung von DOCh und Emalgen 911 konnten LEVIN et al. (1974) Cytochrom P450 aus Rattenlebermikrosomen solubilisieren. Dabei führte Ammoniumsulfatfraktionierung und DEAE-Cellulose-Chromatographie zu einer fünffachen Anreicherung des Enzyms im Vergleich zu den Ausgangsmikrosomen. NADPH-Cytochrom c-Reduktase konnte in dieser Präparation nicht mehr nachgewiesen werden; das funktionelle Lipid wurde durch die Reinigung zu über 98% entfernt. Auch durch die Anwendung einer Kombination von Cholat mit Emalgen 913 gelang es, mikrosomales Cytochrom P450 partiell gereinigt darzustellen (IMAI und SATO, 1974). 34% des ursprünglich eingesetzten Cytochrom P450 konnten dabei in der Hauptfraktion nachgewiesen werden, deren spezifischer P450-Gehalt etwa 2,5 mal höher lag als in den Ausgangsmikrosomen. Cytochrom b_5 und Cytochrom P420 konnten in dieser Fraktion nicht mehr nachgewiesen werden.

1.3. Die Bedeutung des Phospholipids

... und GONN (1968) beschrieben einen hitzestabilen Faktor als essentielle Komponente des Arylethylmittelabbauenden En-

zymsystems. Als chemisches Korrelat des hitzestabilen Faktors wurde eine oder mehrere Lipidkomponenten diskutiert (LU et al., 1969 a). STROBEL et al. (1970) konnten den hitzestabilen Faktor als Phosphatidylcholin identifizieren. Diese Lipide wurden durch die proteolytische Behandlung von Mikrosomen nicht solubilisiert (ITO und SATO, 1969). STROBEL et al. (1970) wiesen darauf hin, daß die Lipidkomponente für den Elektronenübergang von NADPH zu Cytochrom P450 wichtig ist. "Stopped-flow"-Messungen zeigten eine biphasische Reduktionskinetik von Cytochrom P450, sowohl in Lebermikrosomen (GIGON et al., 1969; KUPFER und ORRENIUS, 1970; DEGWITZ et al., 1969), als auch in einem "rekonstituierten enzymatischen System" (COON et al., 1971). Das Phospholipid wird für die erste, schnelle Phase benötigt (STROBEL et al., 1970). CATER et al. (1972) schrieben den Lipiden die Funktion zu, die Hemmung des Typ I-Stoffwechsels durch DCC aufzuheben. CHAPLIN und MANNERING (1970) zeigten einen Zusammenhang zwischen Membranphospholipiden und Typ I-Bindungsstelle auf. Dieser Zusammenhang wird durch das Unvermögen isooktanextrahierter Mikrosomen, mit Typ I-Substraten charakteristische spektrale Effekte hervorgerufen, verdeutlicht (LEISMAN und ESTABROOK, 1971). Zerstörung der lipoprotein Strukturen mit Phospholipase C vermindert den Typ I-Stoffwechsel, ohne ihn jedoch aufzuheben (CHAPLIN und MANNERING, 1970). Diese Befunde führten zu der Annahme, daß die Lipidkomponente für die katalytische Aktivität notwendig ist, jedoch nicht essentiell für die Substratbindung (CHAPLIN und MANNERING, 1970; LU et al., 1969; LU et al., 1970).

Die Lipidfraktion bzw. Phosphatidylcholin erwiesen sich als spektral indifferent (LU et al., 1969 a; COON et al., 1971); auch konnte die spektrale Dissoziationskonstante verschiedener Substrate durch die Lipidfraktion nicht beeinflusst werden (LU et al., 1969 a; LU et al., 1970).

1.4. Rekonstituiertes System

An die Reinigung der Bestandteile des arzneimittelabbau-

den Enzymsystems schlossen sich Untersuchungen über die Bedeutung der einzelnen Komponenten für die enzymatische Aktivität an. Es konnte im rekonstituierten System gezeigt werden, daß neben Cytochrom P450 auch die NADPH-Cytochrom c-Reduktase und die Lipidfraktion für die oxidativen Enzymleistungen essentiell sind (LU und COON, 1968; LU et al., 1969 b; LU et al., 1970; LU et al., 1971; VORE et al., 1974; BERNHARDSON et al., 1973; DUPPEL et al., 1973; LU et al., 1972 b). Demgegenüber scheint Cytochrom b₅ kein obligater Bestandteil des hydroxylierenden Enzymsystems zu sein (LEVIN et al., 1974).

Die Zusammensetzung einer enzymatisch wirksamen Lipidfraktion kann in gewissen Grenzen unterschiedlich sein. So erwiesen sich im rekonstituierten System aus Rattenlebermikrosomen Dioleoylglyceryl- β -phosphorylcholin (STROBEL et al., 1970), Oleoylglyceryl- β -phosphorylcholin (COON et al., 1971), Lauroylglyceryl- β -phosphorylcholin (LU et al., 1971; LU und WEST, 1972) und Phosphatidylcholin (VORE et al., 1974) als wirksame Vertreter der Lipidkomponente. Mit Phosphatidyläthanolaminen konnte dagegen im gleichen rekonstituierten System die enzymatische Aktivität nicht wiederhergestellt werden (COON et al., 1971; FUJITA und MANNERING, 1973). Insgesamt scheint die Bedeutung der Lipidfraktion im rekonstituierten System, unter der der übrigen Komponenten zu liegen. So zeigten LU et al. (1972 a) das Fehlen einer völligen Abhängigkeit der Anilinhydroxylierung im rekonstituierten System vom Phospholipid auf. Für die Beurteilung der Abhängigkeit der Enzymleistungen im rekonstituierten System von lipophilen Substanzen muß auch die Interferenz verschiedener Detergentien mit dem katalytischen Komplex berücksichtigt werden. LU und WEST (1972) sprachen einigen ionischen und nichtionischen Detergentien die Befähigung zum partiellen Ersatz der Lipidfraktion im rekonstituierten System aus Rattenlebermikrosomen zu. Für die am meisten gebräuchlichen anionischen Detergentien Cholat und DOCh wurde eine solche Wirkung jedoch mehrfach bestritten (LU und COON, 1968; LU et al., 1969 a; VORE et al., 1974).

Die Funktion der NADPH-Cytochrom c-Reduktase konnte durch

Versuche im rekonstituierten System weiter aufgeklärt werden. Die gereinigte Reduktase war imstande, den Elektronenfluß von NADPH zu Cytochrom P450 zu katalysieren (FUJITA und MANNERING, 1973) und die Fettsäurehydroxylierung zu ermöglichen (LU et al., 1969 a). Die Fähigkeit der Reduktase, Cytochrom c zu reduzieren, erwies sich als unabhängig von der Cytochrom P450-reduzierenden Aktivität (LU et al., 1969 a).

Die Umsatzgeschwindigkeit im rekonstituierten System ist proportional zur Konzentration einer jeden Komponente, wenn die beiden übrigen Bestandteile im Überschuß vorliegen (LU et al., 1969 a; DUPPEL et al., 1973). Schon 1969(a) hatten LU et al. auf eine inhibitorische Wirkung der Lipidkomponente in höheren Konzentrationen hingewiesen. Diese inhibitorische Wirkung in höheren Konzentrationen wurde von DUPPEL et al. (1973) auch den beiden anderen Komponenten des rekonstituierten Systems zugesprochen.

1.5. Induktion und Spezifität des arzneimittelabbauenden Systems

Die Aktivitäten der mikrosomalen Enzyme können durch gewisse Fremdstoffe gesteigert werden (BROWN et al., 1954). Durch polyzyklische Kohlenwasserstoffe konnte eine vermehrte Enzymproteinsynthese induziert werden (CONNEY et al., 1957). Phenobarbital war ebenfalls in der Lage, die arzneimittelhydroxylierende Aktivität der Lebermikrosomen zu steigern (REMMER, 1959). Als morphologisches Substrat dieser Erscheinung wird eine Vergrößerung des endoplasmatischen Retikulums angesehen (REMMER und MERKER, 1963).

Prototypen der induzierenden Substanzen sind Phenobarbital (PB) und 3-Methylcholanthren (MC) (CONNEY, 1967). Zwischen beiden Induktorklassen ließen sich einige charakteristische Unterschiede feststellen: der Komplex zwischen CO und dem reduzierten Cytochrom P450 zeigte bei MC-Mikrosomen eine Verschiebung des kurzwelligen Absorptionsmaximums im Differenzspektrum um einige Nanometer zum kurzwelligen Bereich (448 nm) (SLADEK und MANNERING, 1966; HILDEBRANDT et al.,

1968; ALVARES et al., 1967). Dazu kommen noch einige andere spektrale Unterschiede, insbesondere bei der Bindung von Liganden an Cytochrom P450 (JEFCOATE und GAYLOR, 1969; GOUJON et al., 1972). Das Spektrum der induzierten enzymatischen Reaktionen ist nach PB breiter als nach MC (CONNEY, 1967). Polychlorierte Biphenyle zeigten die Eigenschaften von beiden Induktortypen (ALVARES et al., 1973).

Die von CONNEY (1967) beschriebene Abhängigkeit der Spezifität des arzneimittelabbauenden Systems von der Art der Induktion konnte auch im rekonstituierten System nachvollzogen werden. So zeigte ein rekonstituiertes System aus Rattenlebermikrosomen nach PB-Vorbehandlung der Tiere eine geringere 3,4-benzpyrenhydroxylierende Aktivität als ein System aus MC-vorbehandelten Tieren (LU et al., 1971; LU et al., 1973). Umgekehrte Befunde wurden bei der Benzphetamin demethylierung erhoben (LU et al., 1971; LU et al., 1973).

Unterschiede in der Substratspezifität von PB-P450 und MC-P450 wurden auch für die Chlorcyclizin-N-Demethylierung (LU et al., 1972 b; LU et al., 1973), die Testosteronhydroxylierung (LU et al., 1972 b; LU et al., 1973), die Anilinderivathydroxylierung (LU et al., 1972 a), die Äthymorphindemethylierung (LU et al., 1973) und die Pentobarbitalhydroxylierung (LU et al., 1973) gezeigt. Cytochrom P450 aus PB-vorbehandelten Tieren (PB-P450) war in der Lage, die Hydroxylierungsrate von 3,4-Benzpyren zu steigern, wenn MC-P450 in geringen Konzentrationen vorlag (WEST und LU, 1972). In höheren Konzentrationen von MC-P450 konnte die 3,4-BP-Hydroxylierung durch PB-P450 gehemmt werden (LU et al., 1972 b; WEST und LU, 1972). Dabei konnte nachgewiesen werden, daß PB-P450 und MC-P450 um die gleiche Reduktase konkurrieren (LU et al., 1972 b; WEST und LU, 1972).

Die Reduktase- und Lipidfraktion erwiesen sich als unabhängig von der Art der Vorbehandlung (LU et al., 1971; LU et al., 1972 b). Eine Abhängigkeit der katalytischen Leistung eines rekonstituierten Systems von der Reduktasequelle wurde jedoch für die N-Demethylierung von Benzphetamin beschrieben (LU et al., 1972 b). Allerdings sind voll

aktive Rekonstitutionen beschrieben worden, bei denen die Komponenten von verschiedenen Spezies stammten: Reduktase- und Lipidfraktion vermochten zusammen mit einem partiell gereinigten Cytochrom P450 aus *Candida tropicalis* ein funktionstüchtiges enzymatisches System zu bilden (DUPPEL et al., 1973). Komponenten aus Rattenleber und Mäuseleber konnten ohne deutliche Aktivitätseinbuße nebeneinander verwendet werden (NEBERT et al., 1973).

In Mikrosomen wurde die Hydroxylierung von 3,4-Benzpyren um 80% vermindert, wenn NADH statt NADPH als Kosubstrat angeboten wurde (CONNEY et al., 1957). Dieser Befund konnte durch Untersuchungen im rekonstituierten System bestätigt werden (LU und WEST, 1972; LU et al., 1969 a; DUPPEL et al., 1973; FUJITA und MANNERING, 1973), wenn auch das Ausmaß der Stoffwechselverminderung mit 13% (LU und WEST, 1972) deutlich geringer war. Demgegenüber beschrieben COHEN und ESTABROOK (1971) eine Steigerung des NADPH-abhängigen Aminopyrinstoffwechsels in Mikrosomen nach NADH-Zugabe.

1.5. Elektronenresonanzuntersuchungen

Weitere Untersuchungen galten dem Verhalten von Mikrosomen und partiell gereinigtem Cytochrom P450 im magnetischen Feld.

Im Laufe des enzymatischen Prozesses ändert sich die Wertigkeit des Hämeisens. Dabei wird dem oxidierten Zustand ein "low-spin-Status" der Elektronen zugeordnet (HASHIMOTO et al., 1962; MASON et al., 1965; ICHIKAWA und YAMANO, 1967 a), der nach Reduktion des Cytochroms in einen "high-spin-Status" übergeht (MIYAKE et al., 1968).

PB-Mikrosomen zeigen im magnetischen Feld vorwiegend das Resonanzspektrum eines low-spin-Ferroproteins, während nach MC-Vorbehandlung die high-spin-Form vorherrscht (HILDEBRANDT et al., 1968). An der Ausprägung der low-spin-Form wurde durch die partielle Reinigung von Cytochrom P450 nichts geändert (STERN et al., 1973; LU et

al., 1969 a). Die high-spin-Form wurde in dem partiell gereinigten MC-P450 gegenüber den MC-Mikrosomen erniedrigt gefunden (STERN et al., 1973).

MIYAKE et al. (1968) zeigten, daß eine Erniedrigung des pH-Wertes (Zunahme der Wasserstoffionenkonzentration) mit einer Zunahme des high-spin-Anteiles einhergeht und von charakteristischen Veränderungen im Absolutspektrum begleitet ist.

Die unterschiedliche Substratspezifität von PB-P450 und MC-P450 ist nach Untersuchungen von STERN et al. (1973) nicht durch den spin-Status beeinflusst.

1.7. Differenzspektren

Die Substrate des mikrosomalen Cytochrom P450 lassen sich aufgrund ihres Verhaltens im oxidiert erfaßten Differenzspektrum in zwei Klassen einteilen (REMMER et al., 1966). Typ I-Substanzen (z.B. Aminopyrin, Hexobarbital, SKF 525, Chlorpromazin, Testosteron, ~~17~~¹⁸B-Östradiol) besitzen ein Absorptionsminimum zwischen 418 nm und 425 nm. Das Absorptionsmaximum liegt zwischen 385 nm und 390 nm. Die Zugabe von Typ II-Liganden (z.B. Nicotin, Nicotinamid, Pyridin, Anilin, p-Aminophenol) führt zu einer maximalen Absorption zwischen 425 nm und 435 nm, während zwischen 390 nm und 405 nm die stärkste Absorptionsabnahme im Differenzspektrum zu beobachten ist (SCHENKMAN et al., 1967).

Die Ausbildung eines Typ II-Spektrums in Mikrosomen ist sowohl nach PB- als auch nach MC-Vorbehandlung begünstigt, während die Fähigkeit, ein Typ I-Spektrum zu bilden, nach MC-Induktion vermindert gefunden wird (SHOEMAN et al., 1969; SCHENKMAN et al., 1969; REMMER et al., 1969). Auch mit P450-Partikeln ergaben sich ähnliche Schwierigkeiten, Typ I-Spektren nach MC-Induktion zu erhalten. LEVIN et al. (1972) zeigten, daß ihr aus Rattenlebermikrosomen gewonnenes Cytochrom P450 regelrechte Typ I- und Typ II-Spektren hervorbringen konnte, wenn die Tiere nicht oder mit PB vorbehandelt waren. Mit MC-P450 konnte nach Hexobar-

bitalzugabe nur ein modifiziertes Typ II-Spektrum erhalten werden, was in Einklang mit Befunden von 3,4-Benzpyren-induzierten Mikrosomen steht (ALVARES et al., 1971). Demgegenüber konnte durch Benzphetamin auch bei MC-P450 ein Typ I-Spektrum hervorgerufen werden (LEVIN et al., 1972). Durch Laurat konnten LU et al. (1969 a) mit ihrem teilgereinigten Cytochrom P450 ein charakteristisches Typ I-Spektrum registrieren. Auch die Ausbildung von Typ II-Spektren in partiell gereinigtem Cytochrom P450 ist nicht in allen Präparationen gleich gut. SYMMS und JUCHAU (1973) beschrieben mit ihren P450-Partikeln aus menschlichen Plazentarmikrosomen regelrechte CO- und Typ I-Spektren, jedoch atypische Typ II-Spektren (435 nm/416 nm). Interessante Aspekte ergaben sich aus Untersuchungen zum Mechanismus der Substratbindung in P450-Partikeln. Entgegen bisherigen Befunden, daß Typ I-Substrate an eine hydrophobe Nichthämstelle des Ferricytochroms gebunden werden (SCHENKMAN und SATO, 1968), war es mit dem partiell gereinigten placentaren Cytochrom P450 möglich, die Bindung von Kohlenmonoxid durch das Typ I-Substrat Androstendion aufzuheben. (SYMMS und JUCHAU, 1973). Auch die Bindung von Liganden des reduzierten Cytochrom P450 ist in P450-Präparationen schon untersucht und mit den in Mikrosomen erhobenen Befunden verglichen worden. Die Bindung von Äthylisocyanid an reduziert gehaltene Mikrosomen führt im Differenzspektrum zu zwei Absorptionsbanden bei 430 nm und 455 nm (OMURA und SATO, 1964 a), die sich in einem pH-abhängigen Gleichgewicht befinden (IMAI und SATO, 1966 b). PB-Induktion verändert das Verhältnis der beiden Gipfel nicht (LANGE, 1968). Der Gipfel bei 455 nm erfährt nach MC-Vorbehandlung eine Vergrößerung (ALVARES et al., 1967). Ein analoges Differenzspektrum konnte auch mit reduzierten submikrosomalen Partikeln beobachtet werden (MIYAKE et al., 1968; FUJITA et al., 1973).

1.8. Molekulare Eigenschaften von Cytochrom P450

Die schon bei der Untersuchung von Mikrosomen geäußerte

Vermutung, daß durch die verschiedenen Induktortypen verschiedene Cytochromtypen bevorzugt gebildet werden (BIDLEMAN und MANNERING, 1970), konnte durch die partielle Reinigung der Bestandteile des Enzymsystems bekräftigt werden. So konnten COMAI und GAYLOR (1973) bei ihren Reinigungsversuchen drei spektral differente Cytochrome aufzeigen, denen drei verschiedene Bindungskonstanten für Cyanid zukamen. Es konnte weiter dargelegt werden, daß die dritte Form des Cytochroms durch MC-Vorbehandlung verstärkt nachgewiesen werden konnte. Die zweite Form konnte vorzugsweise durch PB und die erste Form besonders durch eine Äthylalkoholdiät induziert werden. LU et al. (1971) konnten die Unterschiede in der Substratspezifität des PB- und MC-induzierten Cytochrom P450 in zwei verschiedenen Cytochromen lokalisieren. Durch die partielle Reinigung konnten auch Angaben über das Molekulargewicht des Cytochrom P450 bzw. der verschiedenen Cytochrome vom P450-Typ gemacht werden. SATO et al. (1973) fanden bei der chromatographischen Darstellung ihrer solubilisierten Kaninchenlebermikrosomen sechs Banden, wobei der Hauptbande ein MG von 50 000 entsprach. Ein MG von 50 000 wurde auch von DEHLINGER und SCHIMKE (1972) angenommen. BALLOU et al. (1974) vermuteten, daß Cytochrom P450 aus Polypeptidketten mit einem MG von 51 000 - 58 000 zusammengesetzt ist und daß dem enzymatisch aktiven Enzym ein MG von etwa 300 000 zukommt. Die Meinung, daß Cytochrom P450 aus dissoziationsfähigen Polypeptidketten besteht, wurde auch von SHIKITA et al. (1973) vertreten. Die Art der Induktion des Cytochrom P450 scheint, auf die verschiedenen Untereinheiten unterschiedlich zu wirken. So konnten WELTON und AUST (1974) durch unterschiedliche Vorbehandlung von Ratten chromatographisch verschieden stark ausgeprägte mikrosomale Proteinbanden um ein MG von 50 000 darstellen. Durch PB-Induktion wurde eine Proteinbande mit einem MG von etwa 44 000 verstärkt, während MC-Vorbehandlung das Anwachsen einer Bande um 53 000 herbeiführte. In unbehandelten Tieren herrschte eine Bande mit einem MG von 50 000 vor. In

Gegensatz hierzu sahen LEVIN et al. (1972) nach chromatographischer Darstellung ihres partiell gereinigten Cytochrom P450 eine Hauptbande bei einem MG von 50 000 und eine weitere bei 59 000. PB war imstande, beide Hauptbanden zu verstärken, während durch MC nur die Region um 50 000 deutlicher ausgeprägt wurde. In diese Richtung weisen auch Ergebnisse von ALVAREZ und SIEKELVITZ (1973). Diese Autoren beschrieben in Mikrosomen und P450-Partikeln drei Hauptbanden bei Molekulargewichten von 47 000, 49 000 und 52 000. PB war in der Lage, die Banden bei 47 000 und 49 000 zu verstärken. MC wirkte selektiv auf die Bande bei 52 000. Alle Hauptbanden ließen sich durch kombinierte Gabe von PB und MC oder durch alleinige Gabe polychlorierter Kohlenwasserstoffe verstärken.

Die Errechnung des MG des teilweise gereinigten Cytochrom P450 mittels des Diffusionskoeffizienten und des mittleren spezifischen Volumens ergab einen Wert von etwa 350 000 (AUTOR et al., 1973). Durch Gelfiltration ergab sich ein Wert von 360 000, durch Saccharosedichtegradient ein Wert von 350 000 und durch elektronenmikroskopische Untersuchungen ein Wert von 350 000 (AUTOR et al., 1973). LEVIN et al. (1974) fanden durch Gelchromatographie ein Minimal-MG für Cytochrom P450 aus Rattenlebermikrosomen von 50 000. Durch Sepharose 4B-Chromatographie wurde demgegenüber ein Wert von 600 000 gefunden. Dem aus *Pseudomonas putida* gewonnenen Cytochrom P450 wurde ein MG von 46 000 (YU und GUNSALES, 1970) und 45 000 (TSAI et al., 1971) zugeschrieben.

Untersuchungen zum Reduktionsverhalten des gereinigten Cytochroms bieten interessante Hinweise auf seine Funktion innerhalb der mikrosomalen Elektronentransportkette. BALLOU et al. (1974) konnten zeigen, daß die Reduktion von partiell gereinigtem Cytochrom P450 (Rattenlebermikrosomen) äquimolare Mengen an Dithionit erfordert. Jedes Molekül Cytochrom P450 nimmt dabei zwei Reduktionsäquivalente auf, da Dithionit ein Zweielektronendonator ist. Als zweiter Elektronenakzeptor neben dem Hämeisen wird dabei

eine leicht reduzierbare Disulfidbrücke zwischen zwei P450-Molekülen vermutet. Demgegenüber erwies sich das auf Kampfer gewachsene Cytochrom P450 aus *Pseudomonas putida* als Eielektronenakzeptor (BALLOU et al., 1974).

1.9. Absolutspektren

Die partielle Reinigung von Cytochrom P450 gestattete das Aufzeichnen der Absolutspektren der verschiedenen Funktionszustände der Endoxidase.

Tabelle 1 zeigt eine Zusammenstellung der Absorptionsmaxima in den Absolutspektren des auf verschiedene Weise gereinigten Cytochrom P450.

Unabhängig vom Modus der Reinigung zeigen alle oxidiert erfaßten Absolutspektren drei Hauptbanden mit Absorptionsmaxima zwischen 415 nm und 419 nm im Soretbereich, bei 532 - 541 nm und 565 - 570 nm im sichtbaren Bereich. Nach Dithionitreduktion erfährt der Soretgipfel in den meisten Fällen eine Verbreiterung und gleichzeitige Verkleinerung (MITANI et al., 1971; SATO et al., 1973; RAMSEYER und HARDING, 1973; LEVIN et al., 1972). Die bei LEVIN et al. (1972) beschriebene Verschiebung des Soretgipfels zum langwelligen Bereich nach Dithionitreduktion wird auf eine Verunreinigung der Präparation mit Cytochrom b_5 zurückgeführt. Demgemäß wurde bei völlig b_5 -freien Präparationen eine Verschiebung des Soretgipfels zum kurzwelligen Bereich nach Dithionitreduktion beschrieben (LEVIN et al., 1974; PETERSON, 1971). Cytochrom b_5 wird auch teilweise für die gelegentlich beobachtete Absorptionsbande bei 420 nm nach CO-Begasung des reduzierten Ansatzes verantwortlich gemacht (LEVIN et al., 1974).

In Tabelle 1 wurden folgende Autoren zitiert: 1) PETERSON, 1971; 2) MIYAKE et al., 1968; 3) YONG et al., 1970; 4) MITANI et al., 1971; 5) FUJITA und MANNERING, 1971; 6) SCHLEYER et al., 1972; 7) LEVIN et al., 1972; 8) SATO et al., 1973; 9) RAMSEYER und HARDING, 1973.

Tabelle 1

A b s o l u t s p e k t r e n des teilgereinigten Cytochrom P450

Zustand des Absorptionsbanden (Maxima in nm) P450-Quelle Autor
Cytochroms

		Soret	beta	alpha			
<u>oxidiert</u>	281	418	535	570		Pseudomonas putida 1.	
	360	415-18	532	567		Kaninchen-lebermikros. 2.	
		418	535	570		Kaninchen-lebermikros. 3.	
		416	532	570		Kükenembryo 4.	
		418	537	568		Lebermikros. 5.	
	280	356	416	541	570	625-630	Rattenleber-mikrosomen 6.
							NNR-Mitochon- drien(Rind)
	360-65	418-19	538	569-70			Rattenleber- mikrosomen 7.
		416	535	570	650		Kaninchen- lebermikros. 8.
		418	535	565	640		NNR-Mitochon- drien 9.
<u>reduziert</u> (Dithionit)		408	540				1.
		414	543				2.
		414	550				3.
		415	530				4.
		418	545				5.
		419	555				6.
	419-20	536-38	556				7.
		412	555				8.
		418	555				9.
	<u>red.-+_OO</u>		447	550			
		450	552				2.
		450	560				3.
420		450	550				4.
423		450	548				5.
424-26		448	556				7.
		450					
423		449	557				8.
420		448	545				9.

2. ZIEL DER ARBEIT

1. Die erste Aufgabe besteht darin, mikrosomales Cytochrom P450 durch die Einwirkung eines anionischen Detergens von den Membranen abzulösen und durch fraktionierte Aussalzung mit Ammoniumsulfat möglichst vollständig von den übrigen Bestandteilen des arzneimittelabbauenden Enzymsystems zu trennen. Daran schließen sich Versuche über das spektrale Verhalten des teilgereinigten Cytochroms in den verschiedenen Funktionszuständen der Endoxidase an. Hierbei soll besonders der Einfluß von Phenobarbital- und 3-Methylcholanthrenvorbehandlung auf das Absolutspektrum des CO-bindenden Pigmentes untersucht werden.

2. Die folgenden Untersuchungen gelten der Bindung von Typ I- und Typ II-Substraten an das teilgereinigte oxidierte Cytochrom P450. Die Bindung dieser Liganden wird dabei sowohl im Absolut- als auch im Differenzspektrum erfaßt, und beide Darstellungsformen werden miteinander verglichen. Es interessiert im Rahmen dieser Versuche insbesondere die Frage, wie sich das Bindungsverhalten von Hexobarbital und Metyrapon gegenüber mikrosomalem PB- und MC-induzierten Cytochrom P450 nach partieller Reinigung ändert. Zu diesem Zweck werden die spektralen Dissoziationskonstanten (K_s) für MP und HB in PB- und MC-Mikrosomen bestimmt und den bei den Partikeln gefundenen Werten gegenübergestellt.

3. Die weiteren Untersuchungen gelten der Bindung von Pyridinkörpern an reduziertes teilgereinigtes Cytochrom P450. Zunächst werden die Bindungen dieser Liganden an Cytochrom P450 im Absolut- und Differenzspektrum betrachtet und beide Darstellungen hinsichtlich ihrer Übereinstimmung beurteilt.

Eine Besonderheit des MP-Differenzspektrums in MC-Mikrosomen besteht darin, daß die beiden Soretgipfel nicht zu gleicher Zeit auftreten, sondern ein initial stark ausgeprägter δ_2 -Gipfel zugunsten eines dominierenden δ_1 -

Lipfels im vollentwickelten Spektrum abgebaut ist. Diese Aussage wird auf ihre Gültigkeit für P450-Partikeln untersucht. Ferner wird der Einfluß des umgebenden Ionenmilieus auf die Entstehung der Soretregion im MP-Differenzspektrum betrachtet. In weiteren Versuchen wird die zeitliche Stabilität der spektralen Effekte im MP-Differenzspektrum in Abhängigkeit vom Suspensionsmedium untersucht.

Die Bestimmung der spektralen Dissoziationskonstanten (K_s) für Metyrapon und Tyridin bei PB- und MC-P450-Partikeln soll durch einen Vergleich mit den entsprechenden mikrosomalen Werten die Frage beantworten, ob die Affinität der Endoxidase gegenüber Typ II-Substraten durch Lipidstrukturen in der Umgebung des Cytochrom P450 oder durch das Enzym selbst determiniert wird.

3. METHODEN

3.1. Gewinnung der Mikrosomenfraktion

3.1.1. Vorbehandlung der Tiere

Die Versuchstiere waren männliche Sprague-Dawley-Ratten mit einem durchschnittlichen Körpergewicht von 150 g. Zur Ernährung dienten Wasser und Altromin^R-Trockenfutter (Fa. Altromin, Lage/Lippe). Das Trockenfutter wurde 12 Stunden vor der Tötung den Tieren entzogen. Die erste Gruppe der Tiere wurde nicht vorbehandelt. Die zweite Gruppe erhielt dreimal im Abstand von 24 Stunden eine intraperitoneale Injektion von 0,5 ml Phenobarbital-Natrium (24 mg/ml physiologische Kochsalzlösung), so daß eine Dosis von 80 mg Phenobarbital-Natrium pro kg Körpergewicht erreicht wurde. Der dritten Gruppe wurde in 12stündigem Abstand dreimal 3-Methylcholanthren, suspendiert in Sonnenblumenöl, intraperitoneal injiziert. Die Einzeldosis war dabei auf 20 mg 3-Methylcholanthren pro kg Körpergewicht berechnet. Die Aufbereitung der Mikrosomen erfolgte bei den phenobarbitalvorbehandelten Tieren 24 Stunden, bei den 3-methylcholanthrenvorbehandelten Tieren 36 Stunden nach der letzten Injektion.

3.1.2. Präparation der Mikrosomen

Die Tiere wurden durch Überstrecken der Halswirbelsäule getötet und durch Eröffnen der Halsgefäße entblutet. Anschließend wurde die Leber in situ durch die Pfortader mit kalter physiologischer Kochsalzlösung perfundiert, um das Organ möglichst vollständig von Blut zu befreien. Durch zusätzliche Massage erschien die Leber nach 2-3 Minuten blaß-gelb. Die Lebern wurden darauf bis zum dreifachen Gewicht mit Saccharose-Versen-Tris-Lösung (SVT) aufgewogen (0,25 M Saccharose, 0,02 M Tris-(hydroxy-methyl)-aminomethan, 0,005 M Versen (=Titriplex^R-III = Na-EDTA), mit 1 N HCl auf pH 7,4 eingestellt). Die Le-

bern wurden dann zum Teil in einem Potter-Elvehjem-Homogenisator, zum Teil in einem Ultra-Thurax-Homogenisator (TP 18/2) homogenisiert. Anschließend wurde die Suspension 15 Minuten bei 1 600 x g und darauf 30 Minuten bei 9 000 x g in einer Sorvall-Zentrifuge (RC 2-B) zentrifugiert, um Kernanteile und Mitochondrien aus dem Ansatz zu entfernen. Der Überstand wurde einer einstündigen Zentrifugation bei 105 000 x g in einer Beckmann-Ultrazentrifuge (L2 65 B) unterworfen. Die Resuspension des Sedimentes in SVT-Lösung und erneute Zentrifugation für eine Stunde in der Ultrazentrifuge bei 105 000 x g schlossen sich an. Das Resediment stellte die Mikrosomenfraktion dar und wurde in SVT-Lösung suspendiert, um eine Proteinkonzentration von 30 - 50 mg/ml zu erreichen.

3.1.3. Proteinbestimmung

Der Proteingehalt der Mikrosomen wurde mit der von LOWRY et al. (1951) beschriebenen Methode bestimmt, mit Lab-Trol^R (Dade Reagents Inc., USA) als Standard.

3.2. Partielle Reinigung von Cytochrom P450

Vorbemerkung: 1. Das hier beschriebene Verfahren lehnt sich an die von LU et al. (1971) beschriebene Methode an. 2. Alle Reinigungsschritte wurden bei einer Temperatur von 4°C ausgeführt. Für die Zentrifugengänge wurde immer eine Sorvall-Zentrifuge (RC 2-B) benutzt. Dabei wurde stets 20 Minuten mit 43 500 x g zentrifugiert.

Ausführung: 800 - 1 000 mg mikrosomales Protein wurden auf 61 ml verdünnt. Die Verdünnungslösung bestand aus 14 ml Glycerin, 7 ml 1 M Soerensenphosphatpuffer pH 7,7, 0,7 ml 0,1 M Dithiothreitol (DTT), 0,7 ml 0,1 M EDTA und 0,25 M Saccharose ad 61 ml.

Die Suspension wurde viermal 30 Sekunden einer Ultraschallung unterworfen (Braun-Sonic 125 Homogenisator, Maximalstufe). Um eine Erwärmung des Ansatzes zu vermei-

den, wurde das Suspensionsgefäß für die Dauer der Beschallung in einen Eistopf gestellt. Zwischen den einzelnen Beschallungsschritten lagen jeweils 15 Sekunden. Durch Zugabe von 8 - 10 ml einer 10% Natriumcholatlösung (NaCh) wurde eine Cholatkonzentration von 1 mg pro mg Protein erreicht. Anschließend wurde der Ansatz 20 Minuten geschüttelt.

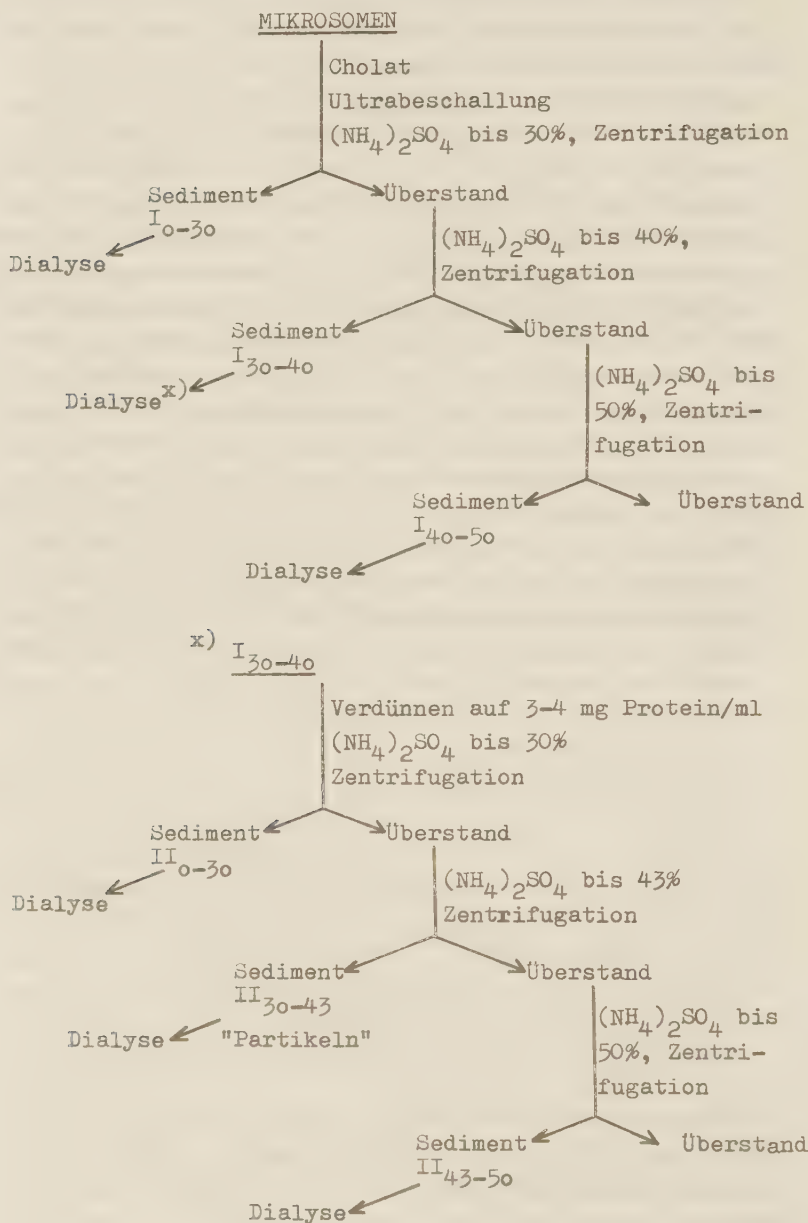
Dann wurde festes Ammoniumsulfat der Suspension bis zu einer Sättigung von 30% zugegeben.^{x)} Darauf wurde zentrifugiert und das entstehende Sediment suspendiert. Als Suspensionsmedium diente ein 0,05 M Soerensenphosphatpuffer pH 7,7 mit 0,1% NaCh, 10^{-4} M DTT, 10^{-4} M EDTA und 20 Vol.% Glycerin. Der Überstand erhielt einen weiteren Zusatz von Ammoniumsulfat bis zu einer Sättigung von 40% und wurde anschließend zentrifugiert. Die Suspension des Sedimentes erfolgte wieder in einem 0,05 M Soerensenphosphatpuffer pH 7,7 mit 0,1% NaCh, 10^{-4} M DTT, 10^{-4} M EDTA und 20 Vol.% Glycerin. Ammoniumsulfat wurde dem Überstand bis zu einer Sättigung von 50% zugesetzt. Nach einem weiteren Zentrifugengang wurde das Sediment in 0,05 M Soerensenphosphatpuffer pH 7,7 mit den oben angegebenen Komponenten suspendiert, während der Überstand nicht weiter verarbeitet wurde. Die suspendierten Sedimente wurden über Nacht dialysiert. Die Dialysierflüssigkeit bestand aus 0,02 M Soerensenphosphatpuffer pH 7,7, dem 0,1% NaCh, 10^{-4} M DTT, 10^{-4} M EDTA und 20 Vol.% Glycerin zugesetzt waren.

Nach Abschluß des Dialysevorganges wurden die drei Fraktionen zentrifugiert und anschließend auf ihren Proteingehalt untersucht (LOWRY et al., 1951). Die Fraktion, die bei einer Ammoniumsulfatzugabe von 30 auf 40 Sättigungsprozent erhalten wurde, erfuhr eine Verdünnung auf einen Proteingehalt von 3 - 4 mg/ml. Die Verdünnungs-

^{x)} Die angegebenen Prozentwerte beziehen sich auf eine 100% gesättigte Lösung (100% Sättigung: 0,767 mg/ml H₂O; GREEN und HUGHES, 1955). Niedrigere Sättigungsangaben sind prozentuale Teilmengen an Ammoniumsulfateingabe, bezogen auf 100%.

flüssigkeit bestand aus 0,02 M Soerensenphosphatpuffer pH 7,7 mit einem Zusatz von 0,2% NaCh, 10^{-4} M DTT, 10^{-4} M EDTA und 20 Vol.% Glycerin. Dann wurde Ammoniumsulfat dieser Fraktion bis zu einer Sättigung von 30% zugefügt. Nach der Zentrifugation wurde das Sediment in einem 0,005 M Soerensenphosphatpuffer pH 7,7 mit 0,1% NaCh, 10^{-4} M DTT, 10^{-4} M EDTA und 20 Vol.% Glycerin suspendiert. Der Überstand erhielt einen Ammoniumsulfatzusatz bis 43% Sättigung und wurde zentrifugiert. Das Sediment wurde wieder suspendiert. Als Suspensionsmedium diente 0,005 M Soerensenphosphatpuffer pH 7,7 mit 0,1% NaCh, 10^{-4} M DTT, 10^{-4} M EDTA und 20 Vol.% Glycerin. Der Überstand wurde durch Ammoniumsulfatzugabe bis 50% weiter aufgeschlossen. Nach einer erneuten Zentrifugation wurde das Sediment in dem zuvor beschriebenen Puffer suspendiert. Die Sedimente wurden über Nacht dialysiert. Der Dialysepuffer enthielt 0,1% NaCh, 10^{-4} M DTT, 10^{-4} M EDTA und 20 Vol.% Glycerin in einem 0,005 M Soerensenphosphatpuffer pH 7,7. Die dialysierten Suspensionen wurden dann zentrifugiert, die Überstände auf ihren Proteingehalt untersucht und in 5 mg-Portionen eingefroren.

Die wichtigsten Reinigungsschritte sind nachstehend in einem Schema zusammengefaßt:



3.3. Meßverfahren

3.3.1. Spektralanalytische Untersuchungstechnik

Die spektralanalytischen Untersuchungen wurden am Spektrophotometer Aminco-Chance durchgeführt. Die Temperatur betrug bei allen Untersuchungen 30°C. Die Ansätze befanden sich in Quarzküvetten mit einem Lichtweg von 1 cm.

3.3.1.1. Spaltstrahlverfahren (split-beam-mode)

Ein Lichtstrahl, der einen bestimmten Wellenlängenbereich kontinuierlich durchmißt, trifft hier in rascher Folge abwechselnd auf Probe- und Vergleichsküvette. Bei gleicher Behandlung von Probe- und Vergleichsansatz läßt sich eine Grundlinie gleicher Lichtabsorption registrieren.

Zur Aufzeichnung von Absolutspektren werden zunächst Probe- und Vergleichsküvette mit Puffer gefüllt und die Basislinie aufgezeichnet. Dann wird die Probeküvette mit der zu untersuchenden Substanz gefüllt, deren spektrale Eigenschaften nun im Vergleich zu dem spektral indifferenten Puffer beobachtet werden können.

Bei der Darstellung von Differenzspektren werden Probe- und Vergleichsküvette mit der gleichen enzymatischen Präparation beschickt und eine Grundlinie gleicher Lichtabsorption aufgezeichnet. Die Zugabe einer die spektralen Eigenschaften verändernden Substanz zur Probeküvette und eines gleichen Volumens an Lösungsmittel zur Vergleichsküvette führt zu einer wellenlängenabhängigen Extinktionsdifferenz zwischen Probe- und Vergleichsmedium. Die Extinktionsdifferenz zwischen zwei festdefinierten Wellenlängen wird unter Berücksichtigung der Grundlinie ermittelt. Die Umrechnung der gemessenen Extinktionsdifferenz auf die zugrundeliegende Substratkonzentration erfolgt mittels des entsprechenden Extinktionskoeffizienten.

3.3.1.2. Doppelwellenlängenverfahren (dual-wavelength-mode)

Bei diesem Verfahren treffen zwei Lichtstrahlen unterschiedlicher, festdefinierter Wellenlänge abwechselnd auf eine Küvette. Die beiden Wellenlängen sind so gewählt, daß die Zugabe einer einen enzymatischen Reaktionsablauf startenden Substanz die spektralen Effekte bei einer Wellenlänge stark beeinflußt und sie an der Vergleichswellenlänge nicht ändert (isosbestischer Punkt). Man registriert auf diese Weise eine Extinktionsänderung als Funktion der Zeit und kann diese mittels des zugehörigen Extinktionskoeffizienten in eine Konzentrationsänderung/Zeit umrechnen.

3.3.2. Spezielle Meßmethoden

3.3.2.1. Hämbestimmung

5 mg Protein wurden mit 5 ml einer 0,15 M NaOH-Lösung, die 20 Vol.-% Pyridin enthielt, versetzt. Der Ansatz wurde auf Probe- und Vergleichsküvette verteilt, die Grundlinie erstellt und die Probe mit 2,5 mg $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ reduziert. In dem derart hervorgerufenen Differenzspektrum wurde die Extinktionsdifferenz zwischen 557 nm und 575 nm als Maß für den Hämgehalt ermittelt. Der Berechnung lag ein Extinktionskoeffizient von $32,4 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ zugrunde (OMURA und SATO, 1964 a).

3.3.2.2. Cytochrom P450

Zu 5 mg Protein wurden 5 ml 0,067 M Soerensenphosphatpuffer pH 7,4 mit 20 Vol.-% Glycerin gegeben. Der gesamte Ansatz wurde mit 5 mg $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ reduziert. Dann wurde die Suspension in Probe- und Vergleichsküvette gegeben und die Grundlinie registriert. Die Probeküvette wurde darauf 1 Minute mit Kohlenmonoxid durchströmt. Dem entstehenden Differenzspektrum wurde die Extinktionsdifferenz zwischen

450 nm (PB-Induktion) bzw. 448 nm (MC-Induktion) und 490 nm unter Berücksichtigung der Grundlinie entnommen. Zur Berechnung diente ein Extinktionskoeffizient von $91 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (OMURA und SATO, 1964 a).

3.3.2.3. Cytochrom P420

Der Gehalt einer Probe an Cytochrom P420 wurde nach einer von LEVIN et al. (1974) beschriebenen Methode bestimmt. Dem CO-begasten dithionitreduzierten Absorptionsspektrum wurde unter Berücksichtigung der Grundlinie die Absorptionsdifferenz zwischen 423 nm und 490 nm entnommen und mittels eines Extinktionskoeffizienten von $213 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ die zugehörige Konzentration des Cytochroms ermittelt.

3.3.2.4. Cytochrom b_5

Da unter aeroben Bedingungen Cytochrom P450 von NADPH und NADH nur gering reduziert wird, während Cytochrom b_5 vollständig reduziert wird (OMURA und SATO, 1962), kann der Nachweis dieses Cytochroms durch NADH-Reduktion des Ansatzes im Differenzspektrum ermittelt werden.

5 mg Protein wurden in 5 ml 0,067 M Soerensenphosphatpuffer pH 7,4 mit 20 Vol.% Glycerin suspendiert und auf Probe- und Vergleichsküvette verteilt. Nach Aufzeichnung der Grundlinie wurde der Probeansatz mit 0,33 mM NADH reduziert. Für die Errechnung des b_5 -Gehaltes wurde die Extinktionsdifferenz zwischen 424 nm und 490 nm gemessen. Der Extinktionskoeffizient war $112,1 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (RAW und MAHLER, 1959).

3.3.2.5. NADPH-Cytochrom c-Reduktase

Der Ermittlung der Cytochrom c-Reduktaseaktivität in Mikrosomen und Partikeln wurde die von MASTERS et al. (1965) beschriebene Methode zugrunde gelegt.

In einer Küvette mit 2,5 ml Endvolumen befanden sich 40 μM EDTA, 13,7 μM Cytochrom c, 0,025 mg Protein und 0,067 M Soerensenphosphatpuffer pH 7,7 mit 20 Vol.% Glycerin. Der Ansatz wurde 5 Minuten im Küvettenständer bei 30°C inkubiert. Dann wurde die Reaktion mit 37,9 μM NADPH gestartet. Im Doppelwellenlängenverfahren wurde nun die wachsende Extinktionsdifferenz zwischen 550 nm und 620 nm als Funktion der Zeit gemessen. Die Absorptionsdifferenz, die 30 Sekunden nach NADPH-Zugabe zu beobachten war, wurde der Berechnung der Enzymaktivität zugrundegelegt. Der numerische Wert der Enzymaktivität/Zeiteinheit wurde mittels eines Extinktionskoeffizienten von 21 $\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ bestimmt (MASSEY, 1959).

3.3.2.6. Substratbindung

Die Bindung von Typ I- und Typ II-Substraten an oxidiertes und reduziertes, teilgereinigtes Cytochrom P450 wurde im Differenzspektrum und im Absolutspektrum beobachtet. Im Falle der Differenzspektren wurden Probe- und Vergleichsküvette mit je 2,5 mg Protein, gelöst in 2,5 ml 0,25 M Kaliumphosphat-Glycerin-Puffer pH 7,8, beschickt. Bei den Absolutspektren befand sich dieser Ansatz nur in der Probeküvette. Wurde die Bindung von Substraten an reduziertes Cytochrom P450 geprüft, so wurde die Ausgangslösung mit 1 mg Dithionit/ml Lösung reduziert.

1,7 x 10⁻⁴ M MP oder 1 mM HB wurden dem oxidiert gehaltenen Cytochrom P450 zugegeben. Dem dithionitreduzierten Ansatz wurden 2,5 x 10⁻⁴ M MP oder 1,82 mM Pyridin zugesetzt.

3.3.2.7. Spektrale Dissoziationskonstanten (K_s)

Zur Ermittlung der Affinität zwischen Cytochrom P450 und den verschiedenen Liganden wurden im Spaltstrahlverfahren der Probeküvette steigende Mengen des Substrates zugesetzt. Die zunehmende Extinktionsänderung zwischen zwei definierten Wellenlängen wurde als Maß

für die wachsende Bindung des Substrates an Cytochrom P450 gewertet. Die Substratzugabe erfolgte bis zur maximalen spektralen Veränderung. Probe- und Vergleichsküvette waren jeweils mit 2,5 mg Protein, suspendiert in 2,5 ml 0,25 M Kaliumphosphat-Glycerin-Puffer pH 7,8, gefüllt. Wenn die Ligandenbindung an reduziertes Cytochrom P450 untersucht wurde, erfolgte eine Dithionit-zugabe, die auf 1 mg pro mg Protein berechnet war. Nach Abschluß der Messung wurden die einzelnen Konzentrationen des Substrates gegen die zugehörigen Extinktionsänderungen in doppelt reziproker Form aufgetragen (SCHENKMAN et al., 1967). Die Steigung der entstehenden Gerade, der Schnittpunkt mit Abszisse und Ordinate und der Korrelationskoeffizient wurden auf einem Wang-Rechner 700 A nach Programmen des Pharmakologischen Institutes ermittelt. Der K_s -Wert wird durch den negativen reziproken Wert des Schnittpunktes der Gerade mit der Abszisse dargestellt.

3.4. Chemikalien

Für die Versuche wurden handelspräparate von analytischem Reinheitsgrad verwendet. Dithiothreitol wurde von der Fa. Calbiochem, Los Angeles, bezogen. Die Firma Ciba Pharmaceutical Company, Summit, N.J., USA, stellte Metyrapon zur Verfügung. Enzyme, Coenzyme und Cytochrom c waren Präparate der Fa. Boehringer und Söhne, Mannheim. Pyridin wurde von der Fa. E. Merck, Darmstadt, bezogen.

4. ERGEBNISSE

4.1. Reinigungserfolg

4.1.1. Quantitative Auswertung

Die einzelnen Fraktionen einer PB- und einer 3-MC-Präparation wurden zunächst auf ihr Volumen, ihren Proteingehalt und ihren Gehalt an Cytochrom P450 untersucht.

Tabelle 2

Reinigung von Cytochrom P450 aus PB- und 3-MC-induzierten Rattenlebermikrosomen. (2 repräsentative Präparationen)

PB-PRÄPARATION					
	Volumen (ml)	Protein (mg)	Cytochrom P450 (nMol) (nMol/mg Protein)		Ertrag (%)
Mikrosomen ^{x)}	23,0	991	1784	1,8	100,0
I ₀₋₃₀	10,2	181	199	1,1	11,2
II ₀₋₃₀	3,5	15	16	1,1	0,9
II ₃₀₋₄₃	10,0	120	312	2,6	17,1
II ₄₃₋₅₀	1,0	2	0,1	0,02	0,006
I ₄₀₋₅₀	5,0	73	88	1,2	4,9
Summe					34,1

x) Die Bezeichnung der einzelnen Fraktionen wurde im Kapitel "Methoden" erklärt.

MC-PRÄPARATION					
	Volumen (ml)	Protein (mg)	Cytochrom P450 (nMol) (nMol/mg Protein)		Ertrag (%)
Mikrosomen	24,3	925	1202	1,3	100,0
I ₀₋₃₀	5,3	198	59	0,3	4,9
II ₀₋₃₀	4,6	30	21	0,7	1,7
II ₃₀₋₄₃	7,7	109	262	2,4	21,7
II ₄₃₋₅₀	2,7	7	0,1	0,02	0,01
I ₄₀₋₅₀	4,3	82	57,4	0,7	4,8
Summe					33,1

Die weiteren Untersuchungen galten der Bestimmung der Hämoproteine und der NADPH-Cytochrom c-Reduktase.

Tabelle 3

Cytochrom P450, Cytochrom b₅, Gesamthämogenhalt und NADPH-Cytochrom c-Reduktase in Mikrosomen und teilgereinigten Fraktionen.

	Cyt. P450 (nMol/mg Protein)	Cyt. b ₅ (nMol/mg Protein)	Häm (nMol/mg Protein)	$\frac{P450+b_5}{Häm} \cdot 100$ (%)	NADPH-Cyt. c-Reduktase (nMol/mg Protein·min)
<u>Mikros.</u>					
KO	1,60	0,68	2,30	99	83
	1,83	0,54	2,54	93	71
PB	1,74	0,57	2,17	106	78
	1,42	0,44	1,91	97	105
MC	1,26	0,38	1,62	101	49
	1,63	0,63	2,30	98	59
<u>I₀₋₃₀</u>					
KO	1,57	0,20	1,70	104	52
	1,09	0,09	1,57	75	22
PB	1,16	0,08	1,12	111	21
	0,70	0,05	1,24	60	19
MC	0,34	0,04	0,80	47	12
	0,88	0,09	1,01	96	36
<u>II₀₋₃₀</u>					
KO	2,22	0,16	2,93	81	71
	1,11	0,03	2,13	53	16
PB	0,73	0,03	2,12	36	16
	0,98	0,04	2,04	50	18
MC	0,75	0,01	0,78	97	10
	1,38	0,05	1,51	95	38
<u>II₃₀₋₄₃</u>					
KO	2,86	0,14	3,30	91	43
	2,65	0,04	3,53	76	33
PB	2,27	0,06	3,17	73	37
	2,53	0,04	3,61	71	33
MC	2,41	0,05	3,10	79	25
	2,85	0,07	3,33	88	38

Fortsetzung Tabelle 3

II₄₃₋₅₀

KO	0,33	0,29	0,92	67	138
	0,26	0,05	0,45	69	162
PB	0,50	0,11	0,72	85	138
	0,14	0,13	0,38	71	153
MC	0,02	0,22	0,31	77	147
	0,66	0,30	0,77	125	152

I₄₀₋₅₀

KO	0,76	0,38	1,31	87	143
	1,16	0,37	2,14	71	155
PB	1,11	0,33	1,96	73	168
	0,36	0,25	1,42	43	333
MC	0,72	0,12	0,86	98	160
	0,76	0,38	1,31	87	200

Dabei ergibt sich, daß die größten Cytochrom P450-Mengen und der höchste Cytochrom P450-Gehalt in der 30 - 43% Ammoniumsulfatfraktion des 2. Aussalzungsganges erscheinen. Diese Fraktion wird im weiteren als "Hauptfraktion" bzw. "Partikeln" geführt.

Tabelle 3 zeigt, daß Cytochrom b_5 noch in allen Fraktionen nachgewiesen werden konnte. Eine verlässliche Aussage über den Gehalt der einzelnen Fraktionen an Cytochrom b_5 konnte jedoch zunächst nicht gemacht werden, da die Bestimmung dieses Enzyms durch NADH-Reduktion des Ansatzes eine ausreichende Menge an NADH-Cytochrom b_5 -Reduktase voraussetzt. Das ist jedoch nur in den Mikrosomen gewährleistet. In den Fraktionen könnte die Diskrepanz zwischen der Summe aus Cytochrom P-450 und Cytochrom b_5 und dem totalen Hämogenalt Hinweise auf eine ungenügende Menge an NADH-Cytochrom b_5 -Reduktase geben. Ein orientierender Versuch unter Verwendung einer nach SPATZ und STRITTMATTER (1975) präparierten NADH-Cytochrom b_5 -Reduktase zeigte jedoch, daß in der P450-reichsten Fraktion (II₃₀₋₄₃) der korrekt gemessene Gehalt an Cytochrom b_5 mit weniger als 5% des gesamten Hämoproteingehaltes nur unwesentlich über den ohne spezifische Reduktase bestimmten Werten

lag. Damit ist eine nennenswerte Interferenz der spektralen Eigenschaften von Cytochrom b_5 mit denen des Cytochrom P450 in dieser Fraktion weitgehend ausgeschlossen. Dagegen fanden wir einen hohen Gehalt an NADH-Cytochrom b_5 -Reduktase in dem Überstand, der am Ende der ersten Aussalzungsreihe nach einer Ammoniumsulfatsättigung von 50% erhalten wurde. Eine weitere Erklärungsmöglichkeit für die oben genannte Diskrepanz in der Hämoproteinbilanz könnte in der partiellen Konversion von Cytochrom P450 zu P420 durch die Isolierungsverfahren bestehen. Tatsächlich konnte durch eine Bestimmung von Cytochrom P420 aus dem CO-begasteten, reduzierten Absolutspektrum, zumindest für die wichtigste Fraktion (II₃₀₋₄₃), die Summe der Hämoproteine in Einklang mit dem totalen Hämgehalt gebracht werden. Diese Methode wurde auch von LEVIN et al. (1974) für deren Fraktionen beschrieben. Der Berechnung von Cytochrom P420 wurde ein Extinktionskoeffizient von $213 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ zugrunde gelegt (LEVIN et al., 1974).

Tabelle 4

Häm- und Hämoproteinbilanz bei teilgereinigtem Cytochrom P450 aus PB-stimulierten Rattenlebermikrosomen (drei repräsentative Fraktionen)

Fraktion	Hämoproteine			Σ Hämoproteine	Häm	$\frac{\Sigma \text{Hämoprot.} \times 100}{\text{Häm}}$
	P450	P420	b ₅			
	(nMol/mg Protein)					(%)
II ^{x)} ₃₀₋₄₃	2,27	0,05	0,06	3,18	3,17	100
II ₃₀₋₄₃	2,65	0,52	0,04	3,21	3,53	91
II ₃₀₋₄₃	2,41	0,78	0,05	3,24	3,10	104

x) Erläuterungen zur Bezeichnung der Fraktionen im Kapitel Methoden.

Die NADPH-Cytochrom c-Reduktase konnte noch in allen Fraktionen nachgewiesen werden. Dieses Enzym war in der Hauptfraktion (II₃₀₋₄₃) gegenüber den Mikrosomen etwa um die

Hälfte vermindert, während in den Fraktionen I₄₀₋₅₀ und II₄₃₋₅₀ eine deutliche Anreicherung der Reduktase gegenüber den Mikrosomen gefunden wurde.

Tabelle 5

Anreicherung von Cytochrom P450 nach partieller Reinigung unter Kontrollbedingungen, nach PB- und MC-Vorbehandlung.

	Cytochrom P450 (nMol/mg Protein)	Anreicherung
Mikrosomen		
KO	1,60	
	1,83	
PB	1,74	
	1,42	
MC	1,26	
	1,63	
I ₀₋₃₀		
KO	1,57	1,0
	1,09	0,6
PB	1,16	0,7
	0,70	0,5
MC	0,34	0,3
	0,88	0,5
II ₀₋₃₀		
KO	2,22	1,4
	1,11	0,6
PB	0,73	0,4
	0,98	0,7
MC	0,75	0,6
	1,38	0,8
II ₃₀₋₄₃		
KO	2,86	1,8
	2,65	1,4
PB	2,27	1,3
	2,53	1,8
MC	2,41	1,9
	2,85	1,7
II ₄₃₋₅₀		
KO	0,33	0,2
	0,26	0,1
PB	0,50	0,3
	0,14	0,1
MC	0,02	0,02
	0,66	0,4

Fortsetzung Tabelle 5

I ₄₀₋₅₀		
KO	0,76	0,5
PB	1,16	0,6
	1,11	0,6
	0,36	0,2
MC	0,72	0,6
	0,76	0,5

Anschließend wurde die Anreicherung von Cytochrom P450 in den verschiedenen Fraktionen betrachtet.

Eine einheitliche Anreicherung von Cytochrom P450 gegenüber den Mikrosomen konnte nur in der Fraktion II₃₀₋₄₃ erreicht werden. Die Anreicherungsfaktoren betrugen 1,8 bei der Kontrollpräparation, etwa 1,5 nach PB-Induktion und 1,8 nach MC-Vorbehandlung der Tiere.

4.1.2. Qualitative Auswertung

Die Absolutspektren der Cytochrom P450-reichsten Fraktion (II₃₀₋₄₃) wurden als wichtigstes qualitatives Kriterium für den Reinigungserfolg untersucht. Dabei fanden wir in Übereinstimmung mit LEVIN et al. (1972) im oxidierten Zustand der Endoxidase Absorptionsmaxima bei 418 nm, 538 nm und 570 nm.

Nach Reduktion mit Natriumdithionit erfuhr der Soretgipfel eine diskrete Verschiebung (2-4 nm) zum langwelligen Bereich bei gleichzeitiger Verringerung der Extinktion. Eine α -Bande konnte bei 557 nm und eine β -Bande bei 536 nm als Schulter dargestellt werden. CO-Zugabe zum reduzierten Ansatz brachte ein Absorptionsmaximum im kurzwelligen Bereich bei 425 nm zur Erscheinung. Im langwelligen Bereich kam ein einziges Maximum bei 557 nm zur Darstellung.

In Tabelle 6 sind diese Daten zusammengestellt.

Tabelle 6

Absorptionsmaxima der Absolutspektren des teilgereinigten Cytochrom P450 nach PB- und MC-Stimulation. (Alle Angaben in nm)

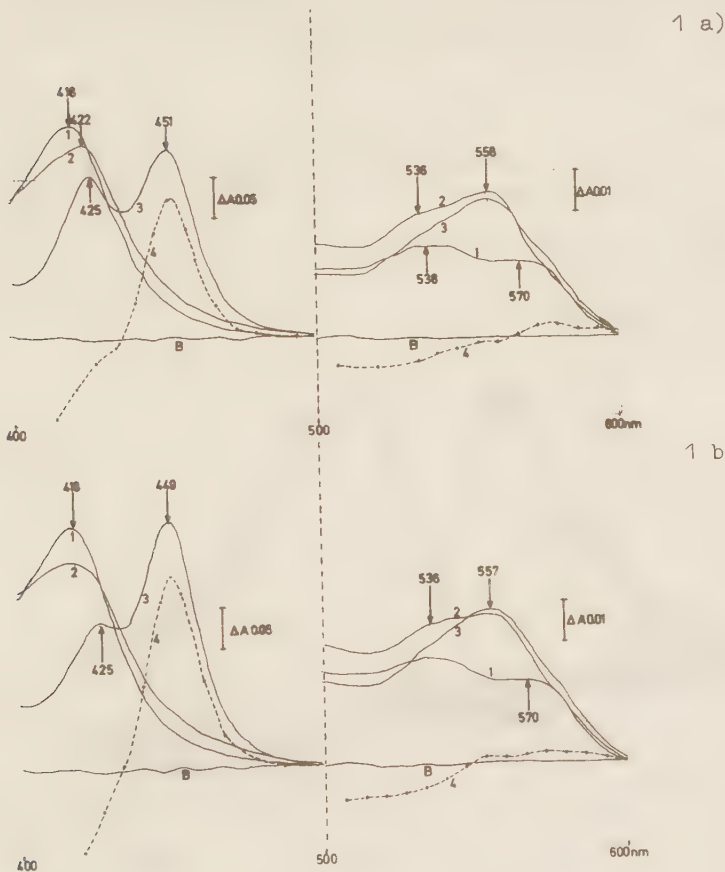
	SORET			
	δ_2	δ_1	β	α
oxidiert	418	-	538	570
Dithionit- reduziert	422 (PB) 420 (MC)	-	536	557
Dithionit + CO	425	449 (MC) 451 (PB)	-	557

Die Absorptionsbande bei 425 nm des CO-Komplexes mit dem reduzierten Cytochrom P450 ist bei PB-P450 stärker ausgeprägt als bei MC-P450 (s. Abb. 1). Die Relation der beiden Soretgipfel konnte durch Glycerinzusatz im Puffer zugunsten des Gipfels bei 450 nm verschoben werden.

Aus den Absolutspektren konnten die Differenzspektren für Cytochrom P450 nach PB- und MC-Induktion ermittelt werden. Das Differenzspektrum wurde erhalten, indem das dithionitreduzierte Absolutspektrum von dem CO-be-gasteten, reduzierten Spektrum graphisch subtrahiert wurde (s. Abb. 1).

Abb. 1

Absolutspektren von teilgereinigtem Cytochrom P450 nach Vorbehandlung mit PB (Abb. 1 a) und MC (Abb. 1 b).



B = Basislinie 1) 1 mg Protein/ml 0,25 M Kaliumphosphat-Glycerin-Puffer pH 7,8 in der Vergleichsküvette 2) Reduktion des Probe- und Vergleichsansatzes mit $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ (4mg/mg Protein) 3) Begasung des reduzierten Ansatzes mit CO (1 min) 4) graph. ermitteltes CO-Differenzspektrum

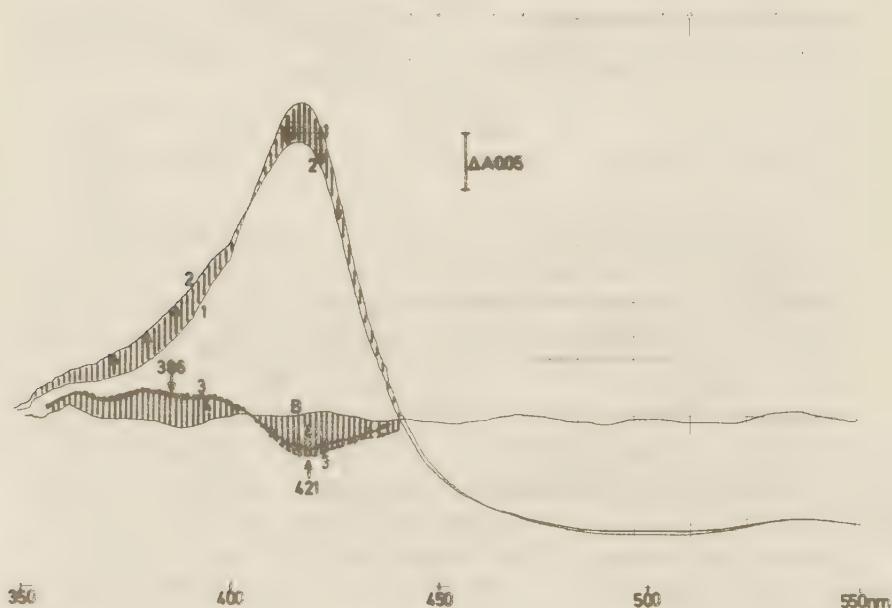
4.2. Substratbindung an oxidiertes teilgereinigtes Cytochrom P450

4.2.1. Qualitative Befunde

Die Absolutspektren zeigten im oxidierten Zustand der P450-Partikeln (II_{30-43}) ein Absorptionsmaximum im Soretbereich bei 418 nm.

Abb. 2

Die Bindung von hexobarbital an teilgereinigtes, oxidiertes Cytochrom P450 aus PB-stimulierten Rattenlebermikrosomen.



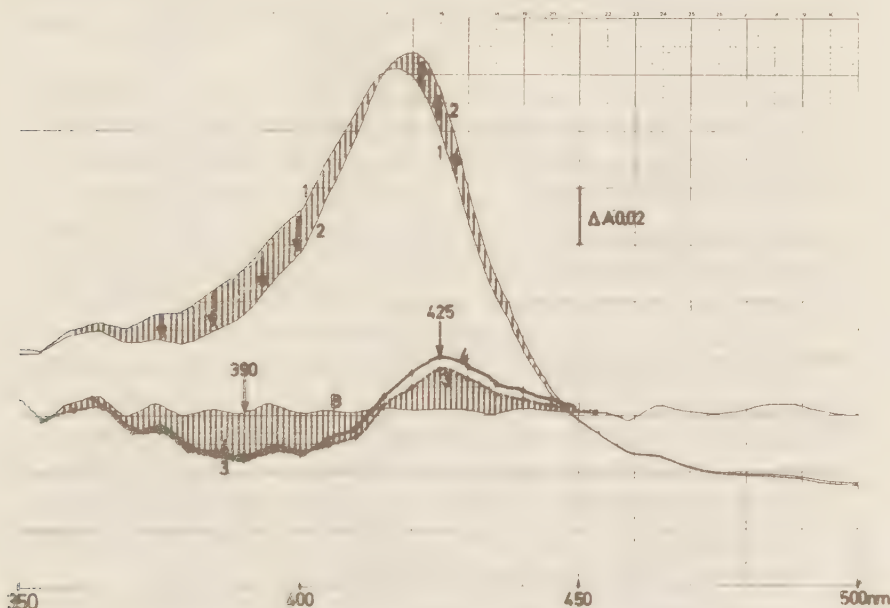
B = Basislinie 1) 1 mg Protein/ml 0,25 M Kaliumphosphat-Glycerin-Puffer pH 7,8 in der Probeküvette 2) 1 mM HB wird der Probeküvette zugegeben, gleiches Volumen an Puffer wird in die Vergleichsküvette eingebracht 3) errechnetes Differenzspektrum 4) gemessenes Differenzspektrum

Durch Zugabe von 1 mM Hexobarbital (HB) kam es zu einer Verschiebung des Spektrums zum kurzwelligen Bereich; es entstand eine Kurve, deren Absorptionsdifferenz zur oxidierten Kurve bei 386 nm am größten positiv und bei 421 nm am größten negativ war. Aus diesen beiden Kurven konnte durch Subtraktion das Differenzspektrum ermittelt werden. Es zeigte gute Übereinstimmung mit dem gemessenen Differenzspektrum.

Die entsprechende Untersuchung wurde auch für das Typ II-Substrat Metyrapon (MP) durchgeführt.

Abb. 3

Die Bindung von Metyrapon an teilgereinigtes, oxidiertes Cytochrom P450 aus PB-stimulierten Rattenlebermikrosomen.



B = Basislinie 1) 1 mg Protein/ml 0,25 M Kaliumphosphat-Glycerin-Puffer pH 7,8 in der Probeküvette 2) $1,7 \times 10^{-4}$ M MP wird der Probeküvette zugegeben, gleiches Volumen an Puffer wird in die Vergleichsküvette eingebracht 3) errechnetes Differenzspektrum 4) gemessenes Differenzspektrum

Im Absolutspektrum wurde durch Zugabe von $1,7 \times 10^{-4}$ M MP zu oxidierten Partikeln das Absorptionsmaximum von 418 nm auf 421 nm verschoben. Die MP-Kurve (2) hatte im Vergleich zur Kurve der substratfreien oxidierten Partikeln (1) bei 425 nm den stärksten Absorptionszuwachs und bei 390 nm die stärkste Absorptionsabnahme erfahren.

4.2.2. Quantitative Befunde

Die spektralen Dissoziationskonstanten (K_s) wurden bei Mikrosomen und Partikeln für HB und MP ermittelt. Dem HB-Differenzspektrum wurde die Absorptionsdifferenz zwischen 420 nm und 490 nm entnommen. Im Falle des MP-Differenzspektrums diente die Extinktionsdifferenz zwischen 427 nm und 490 nm als Berechnungsgrundlage. Die Titrationen wurden stets bis zur maximalen spektralen Veränderung durchgeführt.

Tabelle 7 zeigt, daß MC-Vorbehandlung zu einer Verminderung der maximalen Absorptionsänderungen des HB-Cytochrom P450-Komplexes führt. Dieses gilt sowohl für Mikrosomen als auch für teilgereinigtes Cytochrom P450. Die maximalen spektralen Effekte durch die Bindung des Typ II-Substrates MP an oxidiertes Cytochrom P450 werden durch die unterschiedliche Induktion nicht deutlich beeinflusst. In allen Präparationen waren die maximalen spektralen Änderungen in den Partikeln größer als in den zugehörigen Mikrosomen, wenn die Absorptionsänderungen auf mg Protein/ml Meßsuspension bezogen wurden. Legte man der Berechnung jedoch den Gehalt des Probeansatzes an Cytochrom P450 zugrunde, so zeigte sich kein deutlicher Unterschied zwischen den maximalen spektralen Änderungen in Partikeln und Mikrosomen.

Die Affinität von Typ I- und Typ II-Substraten zum oxidierten Cytochrom P450 nach verschiedener Vorbehandlung wird durch die partielle Reinigung unterschiedlich beeinflusst. Während die Bindung des Typ II-Substrates MP nach partieller Reinigung des PB-P450 und des Kontroll-

Tabelle 7 a und 7 b

Spektrale Dissoziationskonstanten (K_s) und maximale Absorptionsänderungen ($\Delta A_{\max}$) für MP (7 a) und HB (7 b) in oxidierten Mikrosomen und Partikeln unter Kontrollbedingungen, nach PB- und MC-Vorbehandlung. Die Substratzugabe zu den Ansätzen erfolgte in steigenden Konzentrationen von 250 μM bis zur maximalen spektralen Änderung. Der K_s -Wert wurde aus der Regressionsgeraden ermittelt.

7 a)

Metyrapon			
	K_s (μM)	$\Delta A_{\max}$ (427 nm - 490 nm) pro (mg Protein/ml Ansatz) (nMol P450/mg Protein)	
KO	Mikr. 76	0,032	0,020
	Part. 116	0,049	0,017
PB	19	0,040	0,022
	Mikr. 26	0,029	0,017
	23	0,027	0,019
	45	0,054	0,020
PB	Part. 46	0,040	0,018
	31	0,041	0,016
MC	49	0,028	0,022
	100	0,043	0,027
	Part. 26	0,053	0,022
	46	0,078	0,027

7 b)

Hexobarbital			
	K_s (μM)	$\Delta A_{\max}$ (420 nm - 490 nm) pro (mg Protein/ml Ansatz) (nMol P450/mg Protein)	
KO	Mikr. 237	0,020	0,013
	Part. 267	0,025	0,009
PB	170	0,022	0,012
	Mikr. 133	0,028	0,016
	104	0,029	0,019
	134	0,042	0,016
PB	Part. 138	0,023	0,010
	125	0,033	0,013
MC	101	0,004	0,003
	Mikr. 115	0,009	0,005
	Part. 166	0,007	0,003
	227	0,011	0,004

P450 einen gewissen Affinitätsverlust aufweist, scheint es nach Solubilisierung des MC-P450 eher zu einer Verbesserung der MP-Bindung zu kommen. Die Bindung des Typ I-Substrates HB wird durch die Solubilisierung von Kontroll-P450 bzw. PB-P450 nicht beeinflusst; jedoch ist die Affinität von MC-P450 nach partieller Reinigung für dieses Substrat etwas schlechter als in mikrosomalen Präparationen. Die Affinitätsunterschiede zwischen mikrosomalen und teilgereinigten Präparationen sind jedoch gering und überschreiten den Faktor 2 nicht.

4.3. Substratbindung an reduziertes Cytochrom P450

4.3.1. Die Bindung von Pyridin und Metyrapon an teilgereinigtes reduziertes Cytochrom P450 nach PB-Vorbehandlung

Abb. 4 a und b

Absolut- und Differenzspektren der Bindung von Pyridin (Abb. 4 a) und Metyrapon (Abb. 4 b) an teilgereinigtes reduziertes Cytochrom P450 nach PB-Induktion.

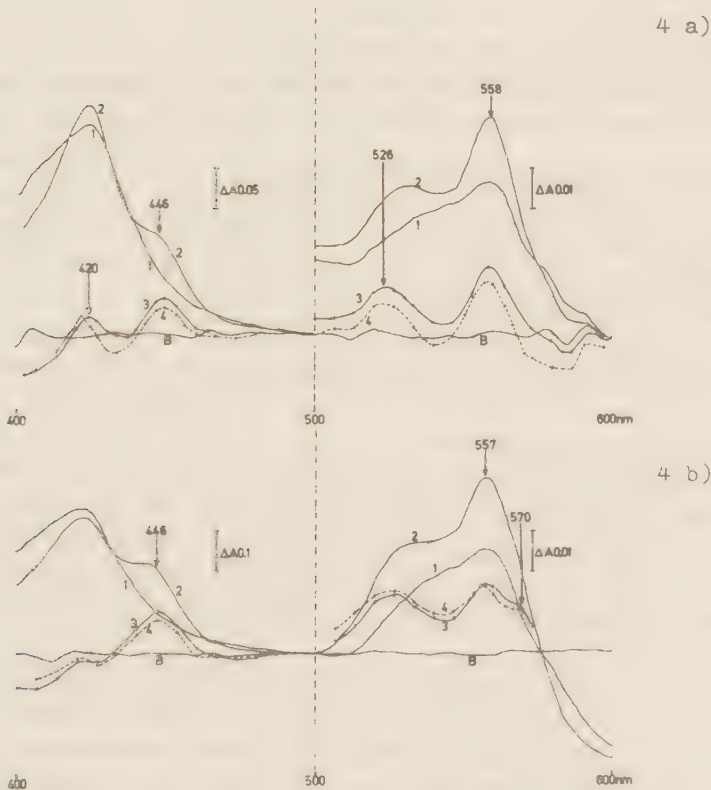


Abb. 4 a: B = Basislinie 1) 1 mg Protein/ml 0,25 M Kaliumphosphat-Glycerin-Puffer pH 7,8 + 1 mg $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ /ml in

der Probeküvette 2) 1,82 mM Pyridin werden der Probeküvette zugegeben, gleiches Volumen an Puffer wird in die Vergleichsküvette eingebracht 3) errechnetes Differenzspektrum 4) gemessenes Differenzspektrum

Abb. 4 b: B = Basislinie 1) 1 mg Protein/ml 0,25 M Kaliumphosphat-Glycerin-Puffer pH 7,8 + 1 mg $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ /ml in der Probeküvette 2) $2,5 \times 10^{-4}$ M MP werden der Probeküvette zugegeben, gleiches Volumen an Puffer wird in die Vergleichsküvette eingebracht 3) errechnetes Differenzspektrum 4) gemessenes Differenzspektrum

Die Zugabe von Metyrapon (MP) zu teilgereinigtem dithionitreduziertem Cytochrom P450 (PB-Induktion) führte zu einem fünf Gipfligen Differenzspektrum mit Absorptionsmaxima bei 420 nm, 446 nm, 527 nm, 557 nm und 570 nm (Schulter).

Pyridin zeigte im Differenzspektrum 4 deutliche Absorptionsbanden: zwei δ -Banden bei 420 nm (δ_2) und 446 nm (δ_1), eine β -Bande bei 526 nm und eine α -Bande bei 558 nm.

Diesen beiden Differenzspektren wurden nun die entsprechenden Absolutspektren gegenübergestellt. Die reduzierten Partikeln hatten Absorptionsbanden bei 420 nm, 536 nm und 557 nm. Durch Anwesenheit von MP im Ansatz wurde eine Extinktionszunahme erreicht, die bei 420 nm, 446 nm, 527 nm und 557 nm maximal war. Die sich bei 446 nm ausprägende Schulter, die dem Differenzspektrum seine charakteristische Gestalt verleiht, ist im MP-freien Absolutspektrum nicht vorhanden.

Die Zugabe von Pyridin zu reduzierten Partikeln führte im Absolutspektrum zu einer Verstärkung des vorderen Soretgipfels bei 420 nm. Zusätzlich trat der zweite Soretgipfel bei 446 nm auf. Im langwelligen Bereich wurde ein starker Absorptionszuwachs bei 526 nm und 558 nm beobachtet.

Die Abbildungen zeigen, daß die im Differenzverfahren registrierten Absorptionsmaxima, hervorgerufen durch MP und Pyridin, auf recht geringen Extinktionsänderungen im Absolutspektrum beruhen. Die qualitative und quantitative Übereinstimmung von Absolut- und Differenzspektren konnte auch hier nachgewiesen werden.

4.3.2. Die Entstehung der Soretregion

Die Ausbildung der beiden Soretgipfel im MP-Differenzspektrum zeigt ein zeitlich auffälliges Verhalten. Der initial sehr stark ausgeprägte γ_2 -Gipfel (425 nm) nimmt zugunsten des γ_1 -Gipfels (446 nm) im vollentwickelten Spektrum ab (JONEN et al., 1974). Dieser Prozeß läuft in MC-Mikrosomen mit einer gut beobachtbaren Geschwindigkeit ab (JONEN et al., 1974). Diese Beobachtung veranlaßte uns zu weiteren Untersuchungen über die spektrale Manifestation der MP-Bindung an reduziertes Cytochrom P450 nach MC-Induktion.

Als Suspensionsmedium für Mikrosomen und Partikeln diente einerseits ein 0,067 M Soerensenphosphatpuffer pH 7,4, andererseits ein 0,25 M Kaliumphosphat-Glycerin-Puffer pH 7,8. Die Ausbildung der Soretregion wurde in 25-sec-Intervallen beobachtet.

Für MC-Mikrosomen konnten wir das von JONEN et al. (1974) beschriebene Verhalten im Soerensenphosphatpuffer nachvollziehen. Bei Verwendung des Kaliumphosphat-Glycerin-Puffers ließ sich ebenfalls eine Abnahme des γ_2 -Gipfels bei Zunahme des γ_1 -Gipfels beobachten. Bei 425 nm war jedoch von Beginn an nur eine schwach ausgeprägte Schulter zu sehen, so daß der γ_1 -Gipfel stets größer als der γ_2 -Gipfel war.

Bei den MC-Partikeln zeigte sich im Soerensenphosphatpuffer ein den Mikrosomen vergleichbares Verhalten. Die Ausbildung des Gipfels bei 446 nm erfolgte jedoch schneller als bei den Mikrosomen, so daß schon 25 Sekunden nach MP-Zugabe ein deutlicher γ_1 -Gipfel zu sehen war.

Im Kaliumphosphat-Glycerin-Puffer wurde wie bei den Mikrosomen der Gipfel bei 425 nm weitgehend unterdrückt und eine hohe Stabilität des Spektrums erreicht.

Abb. 5a, 5b, 5c, 5d

Entstehung der Soretregion im MP-Differenzspektrum bei MC-induzierten Mikrosomen und P450-Partikeln

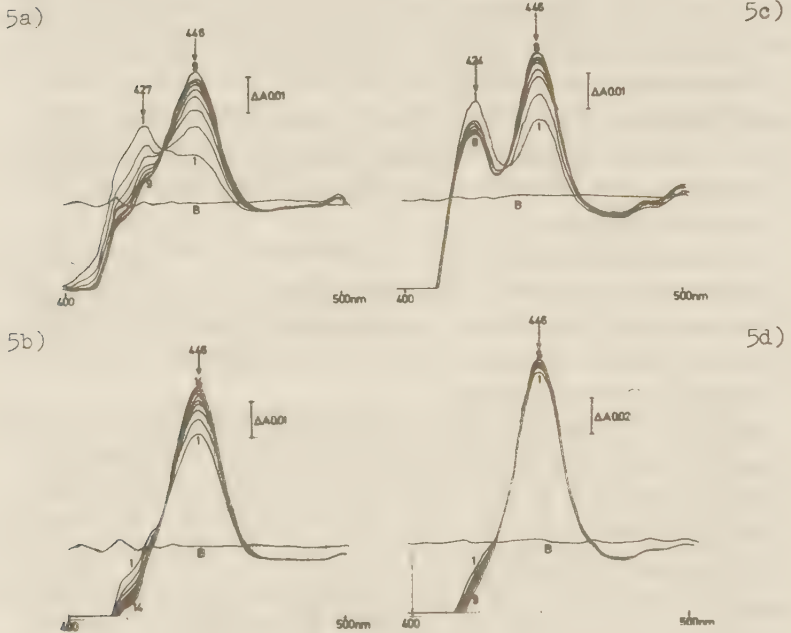


Abb. 5a: MC-Mikrosomen im 0,067 M Soerensenphosphat-puffer pH 7,4

5b: MC-Mikrosomen im 0,25 M Kaliumphosphat-Glyce-rin-Puffer pH 7,8

5c: MC-Partikeln im 0,067 M Soerensenphosphat-puffer pH 7,4

5d: MC-Partikeln im 0,25 M Kaliumphosphat-Glyce-rin-Puffer pH 7,8

B = Basislinie (1 mg Protein/ml Puffer + 1 mg $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ /ml in Probe- und Vergleichsküvette). Die mit Zahlen bezeichne-ten Kurven wurden mit 1 beginnend im Abstand von 25 Se-kunden nach Zugabe von 2,5 mM MP zur Probeküvette und einem gleich großen Volumen an Puffer zur Vergleichskü-vette registriert.

4.3.3. Alterung eines MP-Differenzspektrums

Die Stabilität der Ausprägung eines reduzierten MP-Differenzspektrums in Abhängigkeit vom Suspensionsmedium wurde über eine Stunde beobachtet. 2,5 mM MP wurden dithionitreduzierten Partikeln zugegeben, die einerseits in 0,067 M Soerensenphosphatpuffer pH 7,4 und andererseits in 0,25 M Kaliumphosphat-Glycerin-Puffer pH 7,8 suspendiert waren. Das resultierende Differenzspektrum wurde viermal aufgezeichnet. Die Partikeln stammten aus PB-induzierten Rattenlebermikrosomen. Der Einfluß des Puffers auf die Ausprägung des Spektrums war am deutlichsten in der Soretregion zu sehen. Im Soerensenphosphatpuffer waren zu Beginn der Messung beide Soretgipfel etwa gleich stark ausgeprägt. Im Laufe von 60 min verdoppelte sich die Absorption im λ_2 -Bereich (418 nm), während die Extinktion bei 446 nm etwa um 25% geringer wurde.

Durch den Kaliumphosphat-Glycerin-Puffer konnte dieses Verhalten geändert werden. In der Soretregion wurden über die Meßdauer nur geringfügige Veränderungen bei starker Präponderanz des 446 nm-Gipfels beobachtet. Die α - und β -Banden zeigten eine weitaus geringere Abhängigkeit vom Milieu. Die spektralen Effekte in dieser Region kamen im Soerensenphosphatpuffer etwas deutlicher zur Darstellung. Im Laufe einer Stunde vergrößerten sich die langwelligen Absorptionsänderungen um etwa 20%.

Abb. 6 a und b

Alterung eines MP-Differenzspektrums bei PB-Partikeln im Soerensen- (Abb. 6 a) und Kalium-Phosphat-Glycerin-Puffer (Abb. 6 b).

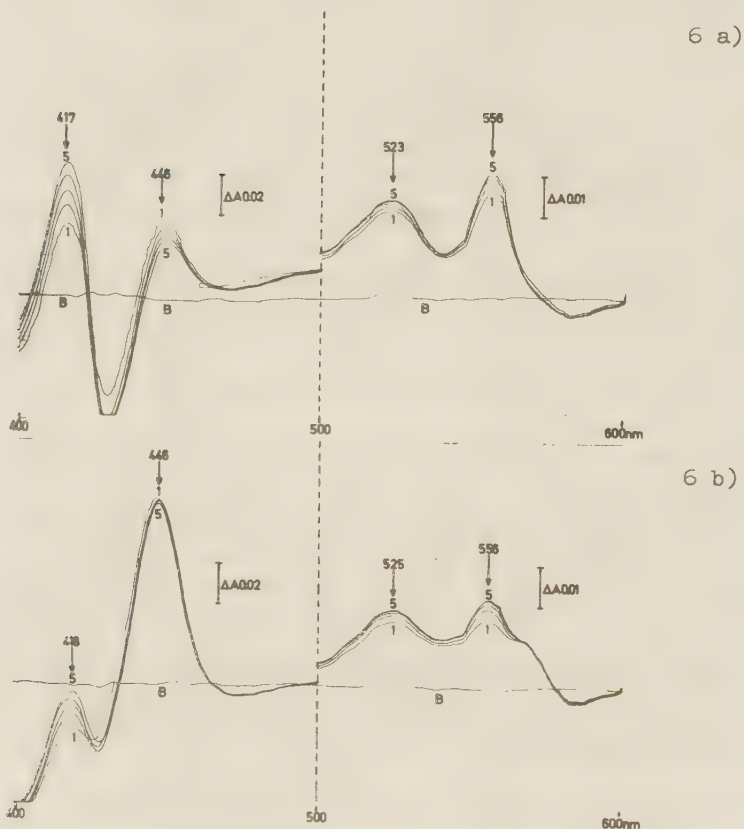


Abb. 6 a: B = Basislinie (1 mg Protein/ml 0,067 M Soerensenphosphatpuffer pH 7,4 + 1 mg $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ /ml in Probe- und Vergleichsküvette) 1) Zugabe von 2,5 mM MP zur Probeküvette und eines gleich großen Volumens an Puffer zur Vergleichsküvette 2) - 5) Registrierung 15, 30, 45 und 60 Minuten nach MP-Zugabe

Abb. 6 b: B = Basislinie (1 mg Protein/ml 0,25 M Kalium-Phosphat-Glycerin-Puffer pH 7,8 + 1 mg $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ /ml in Probe-

und Vergleichsküvette) 1) Zugabe von 2,5 mM MP zur Probeküvette und eines gleich großen Volumen Puffer zur Vergleichsküvette 2) - 5) Registrierung 15, 30, 45 und 60 Minuten nach MP-Zugabe

4.3.4. Spektrale Dissoziationskonstanten (K_s)

Die spektralen Dissoziationskonstanten (K_s), für die Bindung der Typ II-Substrate Pyridin und Metyrapon (MP) an teilgereinigtes dithionitreduziertes Cytochrom P450 sollten weiteren Aufschluß über die Affinität dieser Liganden zu dem Schlüsselenzym des Fremdstoffwechsels geben. Insbesondere sollte der Einfluß der partiellen Reinigung auf das Substratbindungsverhalten untersucht werden.

Den Differenzspektren wurde die Extinktionsdifferenz zwischen 446 nm und 490 nm entnommen. Die Titrationen wurden immer bis zur maximalen spektralen Veränderung durchgeführt.

Diese spektralen Dissoziationskonstanten zeigen, daß die in MC-Mikrosomen im Vergleich zu PB-Mikrosomen beobachtete Affinitätsverschlechterung für Typ II-Substrate auch nach partieller Reinigung von Cytochrom P450 erhalten bleibt. Die Affinität von MP zu den Mikrosomen ist sowohl beim Kontrollversuch als auch nach PB-Vorbenandlung höher als in den entsprechenden Partikeln. Bei Pyridin führt die partielle Reinigung sowohl nach PB- als auch nach MC-Vorbenandlung zu einer leichten Zunahme der Affinität zwischen reduziertem Cytochrom P450 und dem Liganden.

Tabelle 8

Spektrale Dissoziationskonstanten (K_s) für Metyrapon und Pyridin in dithionitreduzierten Mikrosomen und Partikeln unter Kontrollbedingungen, nach PB- und MC-Vorbehandlung.

		METYRAPON	PYRIDIN
		K_s (μM)	K_s (μM)
KO	Mikrosomen ^{x)}	16 ± 2	1370 ± 370
	Partikeln	120	xx)
PB	Mikrosomen ^{x)}	$2,4 \pm 0,2$	2220 ± 490
	Partikeln	5,5	890
		4,3	550
		9,5	1060
MC	Mikrosomen ^{x)}	390 ± 80	4550 ± 670
	Partikeln	586 401	3019 2640

x) Mikrosomenwerte nach JONEN et al. (1974). Es handelt sich dabei um die arithmetischen Mittelwerte ($\bar{x}$) $\pm$ Standardfehler des Mittelwertes ($s_{\bar{x}}$)

xx) Die spektrale Dissoziationskonstante für Pyridin konnte nicht angegeben werden, da die sukzessive Pyridinzugabe zum Ansatz zu einer weitgehenden Konversion von Cytochrom P450 in die P420-Form führte und damit die Menge an aktivem Enzym während der Versuchsdauer ständig abnahm.

5. DISKUSSION

Die in dieser Arbeit beschriebenen Untersuchungen wurden durchgeführt, um den Einfluß von Liganden auf das spektrale Verhalten teilgereinigter Cytochrom P450-Präparationen zu studieren und mit den spektralen Erscheinungen zu vergleichen, die in der intakten mikrosomalen Membran unter dem Einfluß dieser Liganden beobachtet werden. Verfahren zur Herauslösung des CO-bindenden Hämoproteins aus den Strukturen des endoplasmatischen Retikulums sind in zunehmender Zahl beschrieben worden, seit die Funktion dieses Cytochroms im Fremdstoffabbau erkannt wurde.

OMURA und SATO (1962) verwiesen auf die Möglichkeit, Cytochrom P450 mittels des anionischen Detergens DOCh von mikrosomalen Membranen abzulösen. Diese Methode wurde in den folgenden Jahren stetig verbessert. Die Unterstützung der Solubilisierung der Endoxidase durch Ultrabeschallung der Mikrosomen, die Zugabe enzymprotektiver Substanzen und die fraktionierte Aussalzung mit Ammoniumsulfat (LU et al., 1971) führte zur Gewinnung eines partiell gereinigten und enzymatisch aktiven Cytochrom P450. Die von uns verwendete Reinigungsprozedur lehnt sich eng an diese Methode an; Unterschiede bestehen hinsichtlich der Aussalzungsschritte.

Durch unsere Reinigungsversuche gelang es, Cytochrom P450 mit Cholat zu solubilisieren und durch Ammoniumsulfatfraktionierung um den Faktor 1,5 (PB-Induktion) und 1,8 (MC-Induktion) gegenüber den entsprechenden Mikrosomen anzureichern. 18% (PB-Induktion) bzw. 22% (MC-Induktion) des ursprünglich eingesetzten Cytochrom P450 fanden sich in der Hauptfraktion (II_{50-45}). Demgegenüber konnten LU und LEVIN (1972) nur 8% ihres eingesetzten Cytochrom P450 in den Partikeln wiederfinden. Die Anreicherung von Cytochrom P450 in unserer Hauptfraktion bewegt sich in den Grenzen, die von anderen Autoren, die sich einer vergleichbaren Methode bedienten, aufgezeigt wurden (LU und LEVIN, 1972; LEVIN et al., 1972; DUPPEL et al., 1973; HOLLOWAY und WAKIL, 1970; SYMMS und JUCHAU, 1973).

Das Absolutspektrum der gewonnenen P450-Partikeln zeigte im oxidierten Zustand der Endoxidase sowohl nach PB- als auch nach MC-Induktion Absorptionsmaxima bei 418 nm (γ), 538 nm (β) und 570 nm (α). Diese Werte liegen in einem Bereich, der auch von zahlreichen anderen Autoren beschrieben wurde (PETERSON, 1971; MIYAKE et al., 1968; YONG et al., 1970; MITANI et al., 1971; FUJITA und MANNERING 1971; SCHLEYER et al., 1972; LEVIN et al., 1972; SATO et al., 1973; RAMSEYER und HARDING 1973). Nach Reduktion unserer Partikeln mit Natriumdithionit zeigte sich ein Soretgipfel bei 420 - 422 nm. In der α -Region wurde ein Absorptionsmaximum bei 557 nm beobachtet. Auch diese beiden Werte bewegen sich in den von den oben genannten Autoren gezeigten Grenzen. Zusätzlich zeigte sich eine schwach ausgeprägte Schulter bei 536 nm. Die CO-Begasung der reduzierten Partikeln führte zur Ausbildung von Absorptionsbanden bei 425 nm, 451 nm (PB-Vorbehandlung) bzw. 449 nm (MC-Vorbehandlung) und bei 557 nm. Das Absorptionsmaximum bei 425 nm schien in Partikeln aus MC-stimulierten Mikrosomen weniger ausgeprägt zu sein als in solchen aus PB-stimulierten Mikrosomen. Diese kurzwellige Absorptionsbande wurde auch von anderen Autoren für ihre Partikeln beschrieben (MITANI et al., 1971; FUJITA und MANNERING, 1971; SCHLEYER et al., 1972; LEVIN et al., 1972; SATO et al., 1973; RAMSEYER und HARDING, 1973). Demgegenüber konnte PETERSON (1971) für den CO-Komplex des reduzierten bakteriellen Cytochrom P450 nur die Maxima bei 450 nm und 557 nm nachweisen.

Untersuchungen zur Reinheit unserer Cytochrom P450-Fraktion haben wir im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt, jedoch ist aus Publikationen von Autoren, die ein vergleichbares Reinigungsverfahren verwendet haben und ihre Fraktionen gelchromatographisch aufgearbeitet haben, bekannt, daß die "Cytochrom P450-Partikeln" kein einheitliches Protein darstellen, sondern daß in ihnen mehrere Proteinbanden nachweisbar sind (LEVIN et al., 1972; SHIKITA et al., 1973; WELTON und AUST, 1974). So ist z.B.

in unseren Präparationen noch ein erheblicher Anteil des ursprünglichen Flavoproteingehalts vorhanden. Die Verminderung der NADPH-Cytochrom c-Reduktase auf die Hälfte ihrer mikrosomalen Aktivität durch die Reinigungsprozesse wird auch von anderen Autoren mit vergleichbarer Methode beschrieben (LEVIN et al., 1972; LU et al., 1973). Durch die Anwendung spezifischer Proteasen gelingt es allerdings, das Flavoprotein zu 85% (ITO und SATO, 1969) und zu 100% (NIEDERMEIER, 1974) aus den mikrosomalen Membranen herauszulösen. In jüngster Zeit wurde die Kombination eines anionischen Detergens (DOCH) mit dem nichtionischen Detergens Emalgen 913 (IMAI und SATO, 1974) oder Emalgen 911 (LEVIN et al., 1974) zur Solubilisierung von mikrosomalem Cytochrom P450 beschrieben. Insbesondere im Hinblick auf die Reinheit des CO-bindenden Pigments übertrifft die von LEVIN et al. (1974) angegebene Methode die bisher beschriebenen Verfahren deutlich. Mit dieser Methode gelang es zudem, die NADPH-Cytochrom P450-Reduktase vollständig vom Cytochrom P450 zu trennen, ohne daß durch Proteasebehandlung bedingte Störungen bei der Cytochrom P450-Gewinnung in Kauf genommen werden mußten. Es ist anzunehmen, daß in neuester Zeit erzielten Fortschritten bei der Reinigung der mikrosomalen Endoxidase relativ bald die Aufklärung ihrer Struktur folgen wird. Während die Anwesenheit des Flavoproteins in unseren Präparationen sich für die geplanten spektralen Untersuchungen nicht störend auswirken konnte, war es ein wichtiges Erfordernis für die Reinigungsprozedur, andere Hämoproteine aus der Umgebung des Cytochrom P450 zu entfernen, bzw. die Entstehung anderer Hämoproteine im Verlauf der Reinigungsschritte zu vermeiden. Dies war mit der von uns verwendeten Methode möglich: Weder Cytochrom b_5 , noch Cytochrom P420 waren in Konzentrationen, die eine hinderliche Interferenz ihrer spektralen Eigenschaften mit denen des Cytochrom P450 bedingten in den Partikeln vorhanden. Allerdings kam es insbesondere in Präparationen von unbehandelten Tieren zu einer raschen Konversion zu Cyto-

chrom P420. Bei Messung des Cytochrom b_5 -Gehaltes durch Reduktion mit NADH ohne zusätzliche Verwendung einer Cytochrom b_5 -Reduktase ergab sich, sowohl nach PB-Vorbehandlung als auch nach MC-Vorbehandlung, ein Anteil dieses Hämoproteins von 1 - 2% am totalen Hämoprotein-gehalt der Partikeln gegenüber einem Anteil von 23% in den Mikrosomen.

LEVIN et al. (1972) berichteten, daß der Anteil an Cytochrom b_5 in ihren Partikeln zwischen 3 und 9% des Gesamthämogenaltes lag, im Vergleich zu 20 - 37% bei den Mikrosomen. Steapsin-behandelte Mikrosomen dienten in diesem Falle als Cytochrom b_5 -Reduktasequelle.

Eine wesentliche Konversion des Cytochrom P450 in die enzymatisch inaktive P420-Form kann im nach der Methode von OMURA und SATO (1964 b) aufgenommenen Differenzspektrum des CO-Hämoprotein-Komplexes nicht festgestellt werden. Dort findet sich im Bereich um 420 nm nur eine kleine Schulter. Die Analyse der Absolutspektren des CO-Komplexes verweist jedoch auf eine partielle Konversion von Cytochrom P450 in P420, da sich in diesem Absolutspektrum ein deutliches Absorptionsmaximum bei 425 nm markiert. Dieses auch von anderen Untersuchern in Cytochrom P450-Partikeln aus Lebergewebe gefundene Maximum hat bisher eine zwingende Erklärung noch nicht gefunden.

LEVIN et al. (1972) führten das Auftreten einer Absorptionsbande bei 425 nm nach CO-Begasung der reduzierten Partikeln, ebenso die Verschiebung des Soretgipfels von 418 nm auf 420 nm nach Dithionitreduktion der Partikeln, auf einen Restgehalt des Ansatzes an Cytochrom b_5 zurück. Dieses Pigment zeigt im reduzierten Zustand eine Absorptionsbande bei 420 nm (STRITTMATTER und VELICK, 1956).

Eine Bekräftigung zumindest der letzten Annahme stellten die Ergebnisse von LEVIN et al. (1974) dar: ein Cytochrom P450, das frei von Cytochrom b_5 ist, zeigt nach Dithionitreduktion eine Verschiebung des Soretgipfels von 418 nm nach 414 nm (PB-Induktion) bzw. 411 nm (MC-Induktion). Unsere Versuche stehen nicht im Widerspruch zu der

von LEVIN et al. (1972) gemachten Aussage, daß die Ausprägung des 424 nm-Gipfels mit der Kontamination der Partikeln mit Cytochrom b_5 korreliert ist, da auch unsere Präparationen noch einen gewissen Cytochrom b_5 -Gehalt aufweisen. Andererseits konnte eine Abschwächung des genannten Gipfels erreicht werden, wenn sich 20 Vol.-% Glycerin im Ansatz befanden. Diese Tatsache weist darauf hin, daß auch Cytochrom P420 an der Entstehung dieses Gipfels mitbeteiligt ist, da eine reversible Veränderung im Verhältnis der beiden Soretbanden durch An- oder Abwesenheit eines als Enzymstabilisator bekannten Stoffes wie Glycerin nur als Zeichen der Anwesenheit zweier interkonvertibler Erscheinungsformen des Cytochrom P450 gedeutet werden kann. Es kann angenommen werden, daß sich in der Absorptionsbande bei 424 nm die Gegenwart kleiner Mengen sowohl von Cytochrom b_5 als auch von Cytochrom P420 manifestiert. Ein deutlicher Hinweis auf die Mitbeteiligung von Cytochrom P420 am 425 nm-Gipfel des reduzierten CO-Absolutspektrum ist die Tatsache, daß die Ermittlung des Cytochrom P420-Gehaltes unserer Partikeln aus diesem Spektrum nach der Methode von LEVIN et al. (1974) die starke Diskrepanz zwischen der Summe aus Cytochrom P450 und Cytochrom b_5 und dem totalen Hämgehalt voll erklärt. Es sei darauf hingewiesen, daß ein Vergleich der Präparationen nach PB-Vorbehandlung mit der nach MC-Vorbehandlung einige Hinweise darauf gibt, daß das durch MC induzierte Cytochrom P448 stabiler gegenüber inaktivierenden Faktoren ist. So ist der Anreicherungsfaktor mit 1,8 in der MC-Präparation größer als derjenige in den PB-Präparationen (1,5). Die Absorptionsbande bei 425 nm im Absolutspektrum des reduzierten CO-Cytochrom P450-Komplexes ist in den MC-Partikeln weniger stark ausgeprägt als in den PB-Partikeln. Schließlich ist die Diskrepanz zwischen Häm- und Hämoproteingehalt der Hauptfraktion in den PB-Partikeln größer als in den MC-Partikeln. Weitere Untersuchungen mit Partikeln aus MC-stimulierten Mikrosomen sind erforderlich, um diesen Eindruck zu verifizieren.

Als besonders instabil erwiesen sich teilgereinigte Präparationen von Kontroll-P450; diese konvertierten so rasch zu Cytochrom P420, daß eine Bestimmung der Affinität für Liganden teilweise nicht möglich war.

Die Untersuchung der Ligandenbindung an das Cytochrom P450 wurde sowohl im oxidierten als auch im reduzierten Zustand der Endoxidase durchgeführt. Als Liganden des oxidierten Hämoproteins wurden Hexobarbital (HB) als Typ I-Substrat und Metyrapon (MP) als Typ II-Substrat verwendet. Die in den Partikeln gemessenen Differenzspektren für beide Substrate waren weitgehend identisch mit den aus den entsprechenden Absolutspektren errechneten spektralen Differenzen (Abb. 2 und 3) und spiegelten die Blauverschiebung des Spektrums bei Zugabe eines Typ I-Substrats bzw. die Rotverschiebung des Spektrums bei Zugabe eines Typ II-Substrats wider. Die Bindung des Typ I-Substrates HB an oxidierte Mikrosomen führte in unseren Versuchen nur nach vorheriger PB-Induktion zu einem deutlich ausgeprägten Typ I-Differenzspektrum. Die Ausprägung eines Typ I-Differenzspektrums war stark eingeschränkt, wenn die mikrosomalen Enzyme mit MC induziert waren. Die Verminderung des Typ I-Differenzspektrums von HB nach MC-Induktion wurde auch von SHOEMAN et al. (1969) beschrieben.

HB zeigte in unseren Versuchen keine deutlich bessere Affinität zu MC-Mikrosomen im Vergleich zu PB- und Kontrollmikrosomen, wie sie von KATO et al. (1970) für HB und von KUTT et al. (1971) für Phenobarbital und Benzphetamin beschrieben wurde. Andere Autoren fanden die K_s für Äthylmorphin nach MC-Vorbehandlung in Ratten (HAYES und CAMPBELL, 1974) ebenso wie nach PB-Vorbehandlung (HAYES et al., 1973) gegenüber Kontrollen unverändert. Nach partieller Reinigung des Cytochrom P450 wurden mit HB als Ligand ebenfalls charakteristische Typ I-Spektren erhoben. Im Gegensatz zu unseren Befunden konnten LEVIN et al. (1972) mit HB nur ein modifiziertes Typ II-Spektrum erhalten, nachdem Cytochrom P450 aus MC-induzierten Mikrosomen gereinigt worden war. Demgegenüber konnte von

diesen Autoren durch Benzphetamin auch bei MC-P450 ein Typ I-Differenzspektrum hervorgerufen werden (LEVLIN et al., 1972). FUJITA et al. (1973) konnten nachweisen, daß ihr durch Triton N-101 solubilisiertes Cytochrom P450 die Fähigkeit verlor, mit HB ein charakteristisches Typ I-Spektrum zu bilden, wenn eine MC-Behandlung der Tiere vorausgegangen war. Mit teilgereinigtem Cytochrom P450 aus PB-stimulierten Mikrosomen erhielten SOLIMAN et al. (1974) ein typisches HB-Spektrum; wie in unseren Befunden war bei ihnen die maximale spektrale Veränderung nach der Reinigungsprozedur deutlich erhöht, wenn sie auf den Proteingehalt der Meßsuspension bezogen wurde. Diese Erhöhung deuteten die Autoren als Ausdruck der Anreicherung von Cytochrom P450 in den Partikeln. In diese Richtung weisen auch unsere Ergebnisse, da sich die maximalen spektralen Änderungen nach HB-Zugabe nicht ändern, wenn sie auf den Cytochrom P450-Gehalt der Meßsuspension bezogen wurden. Die maximalen spektralen Veränderungen, hervorgerufen durch HB, lagen in MC-Mikrosomen und MC-P450-Partikeln deutlich unter den entsprechenden Werten bei PB-Mikrosomen und PB-P450-Partikeln. Diese schlechte Ausprägung des HB-Differenzspektrums war in MC-Mikrosomen und MC-Partikeln gleich, wenn der Cytochrom P450-Gehalt der Meßsuspension der Berechnung zugrundegelegt wurde.

Die Affinität von Hexobarbital gegenüber oxidiertem MC-induziertem Cytochrom P450 wurde durch die partielle Reinigung der Endoxidase leicht verschlechtert. So stieg der K_s -Wert für HB von etwa $108 \mu\text{M}$ bei MC-Mikrosomen auf etwa $196 \mu\text{M}$ bei MC-Partikeln an. Dieses Verhalten könnte im Falle des lipophilen Typ I-Substrates HB durch den weitgehenden Verlust des funktionellen Lipids durch die Detergensbehandlung bedingt sein. Andererseits führte die partielle Reinigung nicht zu einer Affinitätsabnahme für Hexobarbital, wenn eine PB-Vorbehandlung stattgefunden hatte. Diese Tatsache steht in Kontrast zu den von SOLIMAN et al. (1974) erhobenen Befunden, die einen Affi-

nitätsverlust für HB um den Faktor 7 nach Teilreinigung des Cytochroms P450 von unbehandelten Ratten beobachtet. Dabei war die von diesen Autoren gemessene K_s in den Ausgangsmikrosomen mit 1×10^{-4} M durchaus dem Wert in unseren PB-Mikrosomen, der $1,3 \times 10^{-4}$ M betrug, vergleichbar.

Metyrapon (Typ II-Substrat) zeigte auch mit unserem teilgereinigten oxidierten Cytochrom P450 regelrechte Typ II-Differenzspektren. Unter beiden Vorbehandlungsarten sind die maximalen Absorptionsdifferenzen beim teilgereinigten Cytochrom P450 größer als in den entsprechenden mikrosomalen Spektren, wenn die Extinktionsänderung auf den Proteingehalt der Meßsuspension bezogen wurde. Ähnlich fanden SOLIMAN et al. (1974) auch für das Typ II-Substrat Anilin - ebenso wie für das Typ I-Substrat Hexobarbital - eine Vergrößerung des Differenzspektrums nach partieller Reinigung. Auch hier dürfte sich die Anreicherung des Cytochroms widerspiegeln, denn bei Bezug der maximalen spektralen Veränderungen auf den Cytochrom P450-Gehalt, zeigte sich keine Abhängigkeit dieser Effekte von der Reinigungsprozedur für Metyrapon.

Metyrapon zeigte in unseren Versuchen eine etwas größere Affinität zu PB-Mikrosomen als zu MC-Mikrosomen. In diesem Punkt scheint sich das MP anders zu verhalten als andere Typ II-Substrate, deren Affinität zum Cytochrom P448 größer ist als die zum Cytochrom P450. So wurde von mehreren Arbeitsgruppen eine Abnahme der K_s für Anilin nach MC-Vorbehandlung der Tiere nachgewiesen (KATO et al., 1970; KUTT et al., 1971; HAYES und CAMPBELL, 1974), während PB-Behandlung die Affinität für Anilin nicht wesentlich zu verändern scheint (HAYES et al., 1973). Allerdings entspricht das Verhalten des oxidierten Cytochroms gegenüber dem MP demjenigen des reduzierten Cytochroms, auch dieses bindet nach PB-Vorbehandlung das MP wesentlich besser als nach MC-Vorbehandlung (JONEN et al., 1974).

Die partielle Reinigung brachte für MP im Falle der PB-Induktion eine Affinitätsverschlechterung um den Faktor

1,5 - 2,5, im Falle der MC-Induktion änderte sich der K_s -Wert durch die Isolierungsprozesse nicht einheitlich. Für das Typ II-Substrat Anilin wurde von SOLIMAN et al. (1974) ebenfalls ein Affinitätsverlust beobachtet. Allerdings war dieser wesentlich gravierender als der von uns für die MP-Bindung in PB-Partikeln gefundene.

Im Gegensatz zu HB wird MP auch an die reduzierte mikrosomale Endoxidase gebunden.

Die Bindung von Pyridinkörpern an mikrosomales reduziertes Cytochrom P-450 führt zu einem spektral auffälligen Verhalten, mit einer langwelligen Soretbande um 450 nm (IMAI und SATO, 1967; HILDEBRANDT et al., 1969). Im Rahmen dieser Arbeit wurde diese langwellige Soretbande und ihre Abhängigkeit von der Ligandenkonzentration für die beiden Liganden Pyridin und MP untersucht. Es ist bereits früher gezeigt worden, daß die Affinität des Typ II-Substrates Metycapon gegenüber reduziert gehaltenen Mikrosomen in sehr starkem Maße von der Vorbehandlung der Tiere abhängig ist: die spektrale Dissoziationskonstante (K_s), als Ausdruck der Affinität zwischen Enzym und Substrat, wurde nach PB-Behandlung im Vergleich zu Kontrollmikrosomen vermindert gefunden. Nach MC-Applikation war die Dissoziationskonstante gegenüber den Kontrollmikrosomen etwa 24-fach erhöht, als Ausdruck einer stark reduzierten Affinität (JONEN et al., 1974). Die Fähigkeit, eine Bindung mit Pyridin einzugehen, war bei reduzierten PB-Mikrosomen gegenüber MC-Mikrosomen verdoppelt (JONEN et al., 1974). Unsere Untersuchungen zur Bindung dieser beiden Pyridinkörper dienten neben einer allgemeinen Orientierung über die Bindungskapazität des solubilisierten reduzierten Cytochroms P450 speziell dem Zweck, eine Hypothese zu prüfen, die früher in diesem Labor aufgestellt worden ist (KARL et al., 1974). Nach dieser Hypothese sollte für die deutliche Verschlechterung der MP-Bindung nach Vorbehandlung mit MC nicht das de novo gebildete Apoprotein des Cytochrom P448 verantwortlich sein, sondern möglicherweise eine MC-spezifische Veränderung in der Lipidumgebung des Häm. Auf einen solchen Zusammen-

hang hatten drei Befunde hingedeutet:

- 1) Der Zeitverlauf des Cytochrom P450-Anstiegs während der MC-Induktion entsprach nicht dem Zeitverlauf des Bindungsverlustes für MP.
- 2) Durch die zusätzliche Gabe eines Hemmstoffs der Proteinsynthese, Cycloheximid, konnte die Induktorwirkung auf die vermehrte Produktion von Cytochrom P450 und P448 unterdrückt werden, ein Einfluß auf die spektrale Dissoziationskonstante konnte jedoch nicht festgestellt werden (KAHL et al., 1974). Da die Proteinzusammensetzung sich durch den Induktor trotz Konstanz der Proteinmenge geändert haben kann, sind diese Befunde nicht endgültig beweisend für eine Unabhängigkeit der Bindungskonstanten vom Enzymprotein (KAHL et al., 1974).
- 3) Allerdings konnte durch eine Isooktanextraktion von PB-Mikrosomen, die das funktionelle Lipid weitgehend von den Membranen entfernt (LEIBMAN und ESTABROOK, 1971), eine Erhöhung der Dissoziationskonstanten für MP erreicht werden, die den Werten für die β -MC-Mikrosomen gleichkam (KAHL et al., 1974).

Obwohl ein endgültiger Beweis nicht geführt werden konnte, legten diese Befunde die Vermutung nahe, daß die Induktoren des arzneimittelabbauenden Enzymsystems mehr auf die Lipidkomponenten als auf Cytochrom P450 selbst wirkten. Einen weiteren Schritt zur Beantwortung dieser Frage sollte die in dieser Arbeit gezeigte Bestimmung der spektralen Dissoziationskonstanten von MP beim partiell gereinigten Cytochrom P450 bzw. P448 darstellen.

Da in diesen solubilisierten Präparationen der Einfluß einer Phospholipidkomponente weitgehend ausgeschaltet ist, muß man erwarten, daß sich ähnliche induktionsspezifische Affinitätsunterschiede wie in den Mikrosomen nur dann zeigen, wenn sie auf einem Strukturunterschied der Cytochrome P450 und P448 beruhen, nicht jedoch dann, wenn ihr Grund in einer unterschiedlichen Anordnung der Lipide in der mikrosomalen Membran liegt.

Die in unseren Versuchen bestimmten K_S -werte zeigten, daß

die Affinitätsabnahme von MP und Pyridin zu reduziertem Cytochrom P450 nach 3-MC-Vorbehandlung auch nach partieller Reinigung erhalten bleibt. Die Affinität von MP zu den Mikrosomen ist unter allen Versuchsbedingungen höher, als zu den entsprechenden Partikeln. Bei Pyridin führt die partielle Reinigung unter beiden Induktionstypen zu einer Affinitätszunahme zwischen Enzym und Substrat.

Das Bestehenbleiben der schlechten Affinität von Typ II-Substraten gegenüber reduziertem MC-induzierten Cytochrom P450 auch nach partieller Reinigung, d.h. weitgehender Befreiung von den übrigen Bestandteilen des arzneimittelabbauenden Enzymsystems, verstärkte die Vermutung, daß die Determination der Affinität zwischen Typ II-Substraten und Cytochrom P450 eher in molekularen Eigenschaften des Cytochroms als in umgebenden hydrophoben Strukturen zu suchen ist. Sie bilden damit ein starkes Argument gegen die von KAHL et al. (1974) aufgestellte Hypothese. Ein weiterer Hinweis darauf, daß im Gegensatz zu dieser Hypothese die Annahme einer Beeinflussung der MP-Bindung durch die Lipidstrukturen des endoplasmatischen Retikulums nicht erforderlich ist, bietet sich durch Untersuchungen von KAHL und NEBERT (1974). KAHL und NEBERT (1974) fanden, daß die Applikation von MC bei Mäusen, die unter dem Einfluß polyzyklischer Kohlenwasserstoffe Cytochrom P448 bilden (=genetisch responsive Mäuse), zu der beschriebenen Affinitätsabnahme für MP führt. Bei genetisch nicht responsiven Mäusen, die keine Bildung von Cytochrom P448 nach MC-Vorbehandlung aufweisen, zeigte sich keine Änderung der Affinitätsverhältnisse. Dieses Ergebnis legt die Verantwortlichkeit von Cytochrom P450 bzw. P448 für das Substratbindungsverhalten nahe.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Durch unsere Versuche gelang es, Cytochrom P450 aus PB- und MC-induzierten Rattenlebermikrosomen partiell zu reinigen. Das teilgereinigte Cytochrom P450 war weitgehend von Cytochrom b_5 und Cytochrom P420 frei, die NADPH-Cytochrom c-Reduktase auf die Hälfte ihrer mikrosomalen Aktivität vermindert.

Die Absolutspektren der gewonnenen P450-Partikeln zeigten im oxidierten Zustand Absorptionsmaxima bei 418 nm, 538 nm und 570 nm. Nach Reduktion traten Hauptbanden bei 420 nm, 536 nm und 557 nm auf. Die CO-Begasung der reduzierten Partikeln bewirkte Absorptionsbanden bei 425 nm, 451 nm (PB) bzw. 449 nm (MC) und 557 nm.

Die Bindung der Typ I- und Typ II-Liganden Hexobarbital und Metyrapon an oxidiertes Cytochrom P450 konnte durch die partielle Reinigung der Endoxidase auch im Absolutspektrum erfaßt werden. Dabei konnten die Differenzspektren aus den Absolutspektren graphisch ermittelt werden. Die Bindung von HB und MP an oxidiertes, teilgereinigtes Cytochrom P450 führte in unseren Versuchen zu charakteristischen Typ I- und Typ II-Spektren. Die Ausprägung des HB-Differenzspektrums war hochgradig eingeschränkt, wenn eine MC-Vorbehandlung der Tiere stattgefunden hatte. Die maximalen spektralen Effekte im MP- und HB-Differenzspektrum blieben durch die Isolierungsprozesse unbeeinflusst, wenn sie auf den P450-Gehalt der Meßsuspension bezogen wurden. Die Affinität des oxidierten Cytochrom P450 gegenüber den Liganden wurde durch den Reinigungsvorgang nicht einheitlich beeinflusst; es kam durchweg zu mäßiger Affinitätsverschiebungen. Veränderungen um mehr als einen Faktor 2 wurden nicht beobachtet.

Die Bindung von Metyrapon an reduziertes teilgereinigtes Cytochrom P450 (PB-Induktion) führte im Differenzspektrum zu Absorptionsbanden bei 420 nm, 446 nm, 527 nm, 557 nm und 570 nm. Pyridin rief im Differenzspektrum mit der ebenso behandelten Endoxidase Absorptionsmaxima bei 420 nm, 446 nm, 526 nm und 558 nm hervor. Diese Differenzspektre:

konnten auch aus den zugehörigen Absolutspektren graphisch ermittelt werden.

Die langsame Entstehung der Soretregion im MP-Differenzspektrum von MC-Mikrosomen mit der typischen Interkonvertibilität der beiden λ -Gipfel konnte auch mit partiell gereinigtem Cytochrom P450 nachvollzogen werden. Die Ausprägung dieses Phänomens zeigte eine deutliche Abhängigkeit vom umgebenden Milieu. So fanden wir die λ_1 -Bande (445 nm, von Beginn der Messung an stark begünstigt, wenn der Ansatz in 0,25 M Kaliumphosphat-Glycerin-Puffer pH 7,4 suspendiert war. Diese Präponderanz des λ_1 -Gipfels blieb auch erhalten, wenn das Spektrum über längere Zeit beobachtet wurde. Demgegenüber zeigte das entsprechende Spektrum im 0,067 M Soerensenphosphatpuffer pH 7,4 eine weit- aus geringere zeitliche Stabilität bei deutlichem Hervortreten des λ_2 -Gipfels.

weitere Untersuchungen galten dem Bindungsverhalten von Pyridinkörpern an reduziertes teilgereinigtes Cytochrom P450. Die von anderer Seite formulierte Hypothese, daß die Verschlechterung der Affinität von Pyridinkörpern zu reduziertem Cytochrom P450 nach MC-Induktion auf Veränderungen der funktionellen Lipidstrukturen zurückzuführen ist, konnte durch unsere Versuche nicht bestätigt werden: auch nach partieller Reinigung der Endoxidase, d.h. nach der weitgehenden Entfernung des Phospholipids, blieb die Affinitätsabnahme von MP und Pyridin gegenüber Cytochrom P450 nach MC-Induktion erhalten. Diese Befunde verstärken die Vermutung, daß die Determination der Affinität zwischen Typ II-Substraten und reduziertem Cytochrom P450 eher in molekularen Strukturen des Enzyms als in umgebenden hydrophoben Anteilen zu suchen ist. Die Affinität von Typ II-Liganden gegenüber reduziertem Cytochrom P450 wurde durch die partielle Reinigung unterschiedlich beeinflusst. Für MP wurde unabhängig von der Art der Vorbehandlung eine Affinitätsverschlechterung festgestellt, während die Pyridinbindung bei PB-P450 und MC-P450 nach den Isolierungsprozessen erleichtert war.

7. LITERATURVERZEICHNIS

- ALVARES, A.P., D.R. BICKERS und A. KAPPAS: Polychlorinated biphenyls: a new type of inducer of cytochrome P-448 in the liver. Proc.nat.Acad.Sci.(Wash.) 70 (1973) 1321-1325
- ALVARES, A.P., G. SCHILLING, W. LEVIN und R.KUNTZMAN: Studies on the induction of CO-binding pigments in liver microsomes by phenobarbital and 3-methylcholanthrene. Biochem.biophys.Res.Comm. 29 (1967) 521-526
- ALVARES, A.P., G. SCHILLING, W. LEVIN und R. KUNTZMAN: Inability of substrates to alter the carbon monoxide and ethyl isocyanide difference spectra of microsomal hemoprotein. J.Pharmacol. exp.Ther. 176 (1971) 1-10
- ALVARES, A.P. und P. SIEKEVITZ: Gel electrophoresis of partially purified cytochromes P-450 from rat liver microsomes of variously treated rats. Biochem. biophys.Res.Comm. 54 (1973) 923-929
- APPLEBY, C.A.: A soluble haemoprotein P 450 from nitrogen-fixing Rhizobium bacteroids. Biochim.biophys.Acta (Amst.) 147 (1967) 399-402
- AUTOR, A.P., R.M. KASCHNITZ, J.K. HEIDEMA und M.J. COON: Sedimentation and other properties of the reconstituted liver microsomal mixed-function oxidase system containing cytochrome P-450, reduced triphosphopyridine nucleotide-cytochrome P-450 reductase, and phosphatidylcholine. Molec.Pharmacol. 2 (1973) 93-104
- AXELROD, J.: The enzymatic conversion of codeine to morphine. J.Pharmacol.exp.Ther. 115 (1955) 259-267
- BALLOU, D.P., C. VEEGER, T.A. VAN DER HOEVEN und M.J. COON: Properties of partially purified liver microsomal cytochrome P-450: acceptance of two electrons during an anaerobic titration. FEBS Letters 38 (1974) 337-340

- BERNHARDSON, C., I. BJÖRKHEM, H. DANIELSSON und K. WIKVALL: 12 α -hydroxylation of 7 α -hydroxy-4-cholesten-3-one by a reconstituted system from rat liver microsomes. Biochem.biophys.Res.Comm. 54 (1973) 1030-1037
- BIDLEMAN, K. und G.J. MANNERING: Induction of drug metabolism. V. Independent formation of cytochromes P-450 and P₁-450 in rats treated with phenobarbital and 3-methyl-cholanthrene simultaneously. Molec. Pharmacol. 6 (1970) 697-701
- BLECKER, W., J. CAPDEVILA und M. AGOSIN: Sequential solubilization of microsomal mixed function oxidases. J.biol.Chem. 248 (1973) 8474-8481
- BONT, W.S., P. EMMELOT und H. VAZ DIAS: Studies on plasma membranes. VIII. The effect of sodium deoxycholate and dodecyl sulfate on isolated rat-liver plasma membranes. Biochim.biophys.Acta.(Amst.) 173 (1969) 389-408
- BROWN, R.R., J.A. MILLER und E.C. MILLER: The metabolism of methylated aminoazo dyes. IV. Dietary factors enhancing demethylation in vitro. J.biol.Chem. 209 (1954) 211-222
- CATER, B.R., V. WALKDEN und T. HALLINAN: Is the liver cytochrome P-450-linked biotransformation system lecithin-dependent? Biocnem.J. 127 (1972) 37P-38P
- CHAPLIN, M.D. und G.J. MANNERING: Role of phospholipids in the hepatic microsomal drug-metabolizing system. Molec.Pharmacol. 6 (1970) 631-640
- COHEN, B.S. und R.W. ESTABROOK: Microsomal electron transport reactions. II. The use of reduced triphosphopyridine nucleotide and/or reduced diphosphopyridine nucleotide for the oxidative N-demethylation of aminopyrine and other drug substrates. Arch.Biochem. 143 (1971) 46-53

- COMAI, K. und J.L. GAYLOR: Existence and separation of three forms of cytochrome P-450 from rat liver microsomes. *J.biol.Chem.* 248 (1973) 4947-4955
- CONNEY, A.H.: Pharmacological implications of microsomal enzyme induction. *Pharmacol.Rev.* 19 (1967) 317-366
- CONNEY, A.H., E.C. MILLER und J.A. MILLER: Substrate-induced synthesis and other properties of benzpyrene hydroxylase in rat liver. *J.biol.Chem.* 228 (1957) 753-766
- COON, M.J. und A.Y.H. LU: Fatty acid ω -oxidation in a soluble microsomal enzyme system containing P-450, in: *Microsomes and Drug Oxidations*, Hrsg.v.J.R. GILLETTE, A.H. CONNEY, G.J. COSMIDES, R.W. ESTABROOK, J.R. FOUTS und G.J. MANNERING, New York, London 1969, S.151-166
- COON, M.J., H.W. STROBEL, A.P. AUTOR, J. HEIDEMA und W. DUPPEL: Biological hydroxylation mechanisms, in: *Biochem.Soc.Symp.Nr.34*, Edinburgh 1971, Hrsg.v. G.S. BOYD und R.M.S. SMELLIE, S.45-54
- COOPER, D.Y., S. LEVIN, S. NARASIMHULU, O. ROSENTHAL und R.W. ESTABROOK: Photochemical action spectrum of the terminal oxidase of mixed function oxidase systems. *Science* 147 (1965) 400-402
- CUSHMAN, D.W., R.L. TSAI und I.C. GUNSALUS: The ferro-protein component of a methylene hydroxylase. *Biochem.biophys.Res.Comm.* 26 (1967) 577-583
- DEGKWITZ, E., V. ULLRICH, H. STAUDINGER und W. RUMMEL: Metabolism and cytochrome P-450 binding spectra of (+)- and (-)-hexobarbital in rat liver microsomes. *Hoppe-Seylers Z.physiol.Chem.* 350 (1969) 547-553
- DEHLINGER, P.J. und R.T. SCHIMKE: Effects of phenobarbital, 3-methylcholanthrene, and hematin on the synthesis of protein components of rat liver microsomal membranes. *J.biol.Chem.* 247 (1972) 1257-1264

- DENK, H., J.B. SCHENKMAN, P.G. BACCHIN, F. HUTTERER, F. SCHAFFNER und H. POPPER: Mechanism of cholestasis. III. Interaction of synthetic detergents with the microsomal cytochrome P-450 dependent biotransformation system in vitro. A comparison between the effects of detergents, the effects of bile acids, and the findings in bile duct ligated rats. Exp. molec.Path. 14 (1971) 263-276
- DUPPEL, W., J.-M. LEBAUTL und M.J. COON: Properties of a yeast cytochrome P-450-containing enzyme system which catalyzes the hydroxylation of fatty acids, alkanes, and drugs. Europ.J.Biochem. 36 (1973) 583-592
- ELLIN, Å., S.V. JACOBSSON, J.B. SCHENKMAN und S.ÖRRENIUS: Cytochrome P₄₅₀ of rat kidney cortex microsomes: its involvement in fatty acid ω - and (ω -1)-hydroxylation. Arch.Biochem. 150 (1972) 64-71
- ESTABROOK, R.W., D.Y. COOPER und O. ROSENTHAL: The light reversible carbon monoxide inhibition of the steroid C21-hydroxylase system of the adrenal cortex. Biochem.Z. 338 (1963) 741-755
- FUJITA, T. und G.J. MANNERING: Differences in soluble P-450 hemoproteins from livers of rats treated with phenobarbital and β -methylcholanthrene. Chem.-Biol. Interactions 2 (1971) 264-265
- FUJITA, T. und G.J. MANNERING: Electron transport components of hepatic microsomes. Solubilization, resolution, and recombination to reconstitute aniline hydroxylase activity. J.biol.Chem. 248 (1973) 8150-8156
- FUJITA, T., L.W. SHOEMAN und G.J. MANNERING: Differences in P-450 cytochromes from livers of rats treated with phenobarbital and with β -methylcholanthrene. J.biol.Chem. 248 (1973) 2192-2201

- GARFINKEL, D.: Studies on pig liver microsomes. I. Enzymic and pigment composition of different microsomal fractions. Arch.Biochem. 77 (1958) 493-509
- GIGON, P.L., T.E. GRAM und J.R. GILLETTE: Studies on the rate of reduction of hepatic microsomal cytochrome P-450 by reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate: effect of drug substrates. Molec.Pharmacol. 5 (1969) 109-122
- GILLETTE, J.R., B.B. BRODIE und B.N. LADU: The oxidation of drugs by liver microsomes: on the role of TPNH and oxygen. J.Pharmacol.exp.Ther. 119 (1957) 532-540
- GOUJON, F.M., D.W. NEBERT und J.E. GIELEN: Genetic expression of aryl hydrocarbon hydroxylase induction. IV. Interaction of various compounds with different forms of cytochrome P-450 and the effect on benzo(a)-pyrene metabolism in vitro. Molec.Pharmacol. 8 (1972) 667-680
- GREEN, A.A. und W.L. HUGHES: Protein fractionation on the basis of solubility in aqueous solutions of salts and organic solvents. In: Methods in enzymology, Bd. I, Hrsg.v. S.P.COLOWICK und N.O. KAPLAN, New York, 1955, S.67-90
- GREEN, D.E. und J.F. PERDUE: Membranes as expressions of repeating units. Proc.nat.Acad.Sci.(Wash.) 55 (1966) 1295-1302
- HARDING, B.W., S.H. WONG und D.H. NELSON: Carbon monoxide-combining substances in rat adrenal. Biochim.biophys. Acta (Amst.) 92 (1964) 415-417
- HASHIMOTO, Y., T. YAMANO und H.S. MASON: An electron spin resonance study of microsomal electron transport. J.biol.Chem. 237 (1962) 3843-3844
- HAYES, J.R. und T.C. CAMPBELL: Effect of protein deficiency on the inducibility of the hepatic microsomal drugs-metabolizing enzyme system.- III. Effect of β -methylcholanthrene induction on activity and binding kinetics. Biochem.Pharmacol. 23 (1974) 1721-1731

- HAYES, J.R., M.U.K. MGBODILE und T.C. CAMPBELL: Effect of protein deficiency on the inducibility of the hepatic microsomal drug-metabolizing enzyme system.- I. Effect on substrate interaction with cytochrome P-450. *Biochem.Pharmacol.* 22 (1973) 1005-1014
- HEEDEGARD J. und I.C. GUNSALUS: Mixed function oxidation. IV. An induced methylene hydroxylase in camphor oxidation. *J.biol.Chem.* 240 (1965) 4038-4043
- HILDEBRANDT, A.G., K.C. LEIBMAN und R.W. ESTABROOK: Metyrapone interaction with hepatic microsomal cytochrome P-450 from rats treated with phenobarbital. *Biochem.biophys.Res.Comm.* 37 (1969) 477-485
- HILDEBRANDT, A.G., H. REMMER und R.W. ESTABROOK: Cytochrome P-450 of liver microsomes -- one pigment or many? *Biocnem.biophys.Res.Comm.* 30 (1968) 607-612
- HOLLOWAY, P.W. und S.J. WAKIL: Requirement for reduced diphosphopyridine nucleotide-cytochrome b₅ reductase in stearyl coenzyme A desaturation. *J.biol.Chem.* 245 (1970) 1862-1865
- MORECKER, B.L.: Triphosphopyridine nucleotide-cytochrome c reductase in liver. *J.biol.Chem.* 183 (1950) 593-605
- ICHIHARA, K., E. KUSUNOSE und M. KUSUNOSE: Reconstitution of a fatty acid ω -hydroxylation system by a solubilized kidney microsomal preparation, ferredoxin, and ferredoxin-NADP reductase. *Biocnim.biophys.Acta (Amst.)* 202 (1970) 560-562
- ICHIHARA, K., E. KUSUNOSE und M. KUSUNOSE: A fatty acid ω -hydroxylation system solubilized from porcine kidney cortex microsomes. *Biochim.biophys.Acta* 239 (1971) 178-189
- ICHIKAWA, Y. und T. YAMANO: Electron spin resonance of microsomal cytochromes. Correlation of the amount of CO-binding species with so-called microsomal Fe_x in microsomes of normal tissues and liver microsomes of sudan III-treated animals. *Arch.Biocnem.* 121 (1967 a) 742-749

- ICHIKAWA, Y. und T. YAMANO: Reconversion of detergent- and sulfhydryl reagent-produced P-420 to P-450 by polyols and glutathione. *Biochim.biophys.Acta* (Amst.) 131 (1967 b) 490-497
- IMAI, Y. und R. SATO: Substrate interaction with hydroxylase system in liver microsomes. *Biochem.biophys. Res.Comm.* 22 (1966 a) 620-626
- IMAI, Y. und R. SATO: Evidence for two forms of P-450 hemoprotein in microsomal membranes. *Biochem.biophys.Res. Commun.* 23 (1966 b) 5-11
- IMAI, Y. und R. SATO: Conversion of P-450 to P-420 by neutral salts and other reagents. *Europ.J.Biochem.* 1 (1967) 419-426
- IMAI, Y. und R. SATO: An affinity column method for partial purification of cytochrome P-450 from phenobarbital-induced rabbit liver microsomes. *J.Biochem.(Tokyo)* 75 (1974) 689-697
- IMAI, Y. und P. SIEKEVITZ: A comparison of some properties of microsomal cytochrome P-450 from normal, methylcholanthrene-, and phenobarbital-treated rats. *Arch.Biochem.* 144 (1971) 143-159
- ISHIDATE, K., K. KAWAGUCHI, K. TAGAWA und B. HAGIHARA: Hemoproteins in anaerobically grown yeast cells. *J.Biochem.(Tokyo)* 65 (1969) 375-383
- ITO, A. und R. SATO: Purification by means of detergents and properties of cytochrome b_5 from liver microsomes. *J.biol.Chem.* 243 (1968) 4922-4923
- ITO, A. und R. SATO: Proteolytic microdissection of smooth-surfaced vesicles of liver microsomes. *J. Cell Biol.* 40 (1969) 179-189
- JEFCOATE, C.R.E., R.L. CALABRESE und J.L. GAYLOR: Ligand interaction with hemoprotein P-450. III. The use of n-octylamine and ethyl isocyanide difference spectroscopy in the quantitative determination of high- and low-spin P-450. *Molec.Pharmacol.* 6 (1970) 391-401

- JEFCOATE, C.R.E. und J.L. GAYLOR: A model for the interaction of cytochrome P-450 with carbon monoxide. J.Amer.chem.Soc. 91 (1969) 4610-4611
- JONEN, H.G., B. HÜTHWOHL, R. KAHL und G.F. KAHL: Influence of pyridine and some pyridine derivates on spectral properties of reduced microsomes and on microsomal drug metabolizing activity. Biochem.Pharmacol. 23 (1974) 1319-1329
- KAHL, G.F. und P.W. NEBERT: Gentic differences in metapyrone binding to microsomal cytochromes P450 and P₁450 in mouse liver. Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmak.exp.Path. 284 (1974) R 37
- KAHL, R., H.G. JONEN und G.F. KAHL: Effect of phenobarbital and 3-methylcholanthrene administration in vivo and isoctane extraction in vitro on metapyrone binding to reduced cytochrome P-450. Biochem. Pharmacol. 23 (1974) 2305-2314
- KATAGIRI, M., B.N. GANGULI und I.C. GUNSALUS: A soluble cytochrome P-450 functional in methylene hydroxylation. J.biol.Chem. 243 (1968) 3543-3546
- KATO, R., A. TAKANAKA und M. TAKAYANAGHI: Substrate-induced spectral change of liver microsomes in phenobarbital- and methylcholanthrene-treated male and female rats. J.Biochem.(Tokyo) 68 (1970) 395-413
- KLINGENBERG, E.: Pigments of rat liver microsomes. Arch. Biochem. 75 (1958) 376-386
- KUPFER, D. und E. JARRENIUS: Characteristics of guinea pig liver and adrenal monooxygenase systems. Molec. Pharmacol. 6 (1970) 221-230
- KUPF, H., D. WATERS und J.R. FOOTS: The effects of some stimulators (inducers) of hepatic microsomal drug-metabolizing enzyme activity on substrate induced difference spectra in rat liver microsomes. J.Pharmacol.exp.Ther. 179 (1971) 101-113

- LaDU, B.N., L. GAUDETTE, N. TROUSOF und B.B. BRODIE:
Enzymatic dealkylation of aminopyrin (Pyramidon)
and other alkylamines. J.biol.Chem. 214 (1955)
741-752
- LANGE, G.: Hydroxylase-Aktivität und Hämoprotein-Gehalt
von Mikrosomen aus Kaninchenleber. Naunyn Schmiede-
berg's Arch.Pharmak.exp.Path. 259 (1968) 221-238
- LEIBMAN, K.C. und R.W. ESTABROOK: Effects of extraction
with isooctane upon the properties of liver micro-
somes. Molec.Pharmacol. 7 (1971) 26-32
- LEVIN, W., A.Y.H. LU, D. RYAN, S. WEST, R. KUNTZMAN und
A.H. CONNEY: Partial purification and properties of
cytochromes P-450 and P-448 from rat liver micro-
somes. Arch.Biochem. 153 (1972) 543-553
- LEVIN, W., D. RYAN, S. WEST und A.Y.H. LU: Preparation
of partially purified, lipid-depleted cytochrome
P-450 and reduced nicotinamide adenine dinucleotide
phosphate-cytochrome c reductase from rat liver mi-
crosomes. J.biol.Chem. 249 (1974) 1747-1754
- LINDENMAYER, A. und L. SMITH: Cytochromes and other pig-
ments of Baker's yeast grown aerobically and
anaerobically. Biochim.biophys.Acta (Amst.) 93
(1964) 445-461
- LOWRY, O.H., N.J. ROSEBROUGH, A.L. FARR und R.J. RANDALL:
Protein measurement with the folin phenol reagent.
J.biol.Chem. 193 (1951) 265-275
- LU, A.Y.H. und M.J. COON: Role of hemoprotein P-450 in
fatty acid ω -hydroxylation in a soluble enzyme
system from liver microsomes. J.biol.Chem. 243
(1968) 1331-1332
- LU, A.Y.H., M. JACOBSON, W. LEVIN, S.B. WEST und R.
KUNTZMAN: Reconstituted liver microsomal enzyme
system that hydroxylates drugs other foreign com-
pounds, and endogenous substrates. IV. Hydroxylation
of aniline. Arch.Biochem. 153 (1972 a) 294-297

- LU, A.Y.H., K.W. JUNK und M.J. COON: Resolution of the cytochrome P-450-containing ω -hydroxylation system of liver microsomes into three components. J.biol. Chem. 244 (1969 a) 3714-3721
- LU, A.Y.H., R. KUNTZMAN, S. WEST und A.H. CONNEY: Reconstituted liver microsomal enzyme system that hydroxylates drugs, other foreign compounds, and endogenous substrates. I. Determination of substrate specificity by the cytochrome P-450 and P-448 fractions. Biochem.biophys.Res.Comm. 42 (1971) 1200-1206
- LU, A.Y.H., R. KUNTZMAN, S.B. WEST, M. JACOBSON und A.H. CONNEY: Reconstituted liver microsomal enzyme system that hydroxylates drugs, other foreign compounds, and endogenous substrates. II. Role of the cytochrome P-450 and P-448 fractions in drug and steroid hydroxylations. J.biol.Chem. 247 (1972 b) 1727-1734
- LU, A.Y.H. und W. LEVIN: Partial purification of cytochromes P-450 and P-448 from rat liver microsomes. Biochem.biophys.Res.Comm. 46 (1972) 1334-1339
- LU, A.Y.H., W. LEVIN, S.B. WEST, M. JACOBSON, D. RYAN, R. KUNTZMAN und A.H. CONNEY: Reconstituted liver microsomal enzyme system that hydroxylates drugs, other foreign compounds, and endogenous substrates. VI. Different substrate specificities of the cytochrome P-450 fractions from control and phenobarbital treated rats. J.biol.Chem. 248 (1973) 456-460
- LU, A.Y.H., H.W. STROBEL und M.J. COON: Hydroxylation of benzphetamine and other drugs by a solubilized form of cytochrome P-450 from liver microsomes: lipid requirement for drug demethylation. Biochem. biophys.Res.Comm. 36 (1969 b) 545-551
- LU, A.Y.H., H.W. STROBEL und M.J. COON: Properties of a solubilized form of the cytochrome P-450-containing mixed-function oxidase of liver microsomes. Molec. Pharmacol. 6 (1970) 213-220

- LU, A.Y.H. und S.B. WEST: Reconstituted liver microsomal enzyme system that hydroxylates drugs, other foreign compounds, and endogenous substrates. III. Properties of the reconstituted 3,4-benzpyrene hydroxylase system. *Molec.Pharmacol.* 8 (1972) 490-500
- MacLENNAN, D.H., A. TZAGOLOFF und D.G. McCONNELL: The preparation of microsomal electron-transfer complexes. *Biochim.biophys.Acta (Amst.)* 131 (1967) 59-80
- MASON, H.S.: Mechanism of oxygen metabolism. *Advanc. Enzymol.* 19 (1957) 79-233
- MASON, H.S., J.-C. NORTH und M. VANNESTE: Microsomal mixed-function oxidations: the metabolism of xenobiotics. *Fed.Proc.* 24 (1965) 1172-1180
- MASSEY, V.: The microestimation of succinate and the extinction coefficient of cytochrome c. *Biochim. biophys.Acta* 34 (1959) 255-256
- MASTERS, B.S.S., H. KAMIN, Q.H. GIBSON und C.H. WILLIAMS Jr.: Studies on the mechanism of microsomal triphosphopyridine nucleotide-cytochrome c reductase. *J.biol.Chem.* 240 (1965) 921-931
- MIHARA, K. und R. SATO: Partial purification of NADH-cytochrome b₅ reductase from rabbit liver microsomes with detergents and its properties. *J.Biochem. (Tokyo)* 71 (1972) 725-735
- MITANI, F., A.P. ALVARES, S. SASSA und A. KAPPAS: Preparation and properties of a solubilized form of cytochrome P-450 from chick embryo liver microsomes. *Molec.Pharmacol.* 7 (1971) 280-292
- MITOMA, C., H.S. POSNER, H.C. REITZ und S. UDENFRIEND: Enzymatic hydroxylation of aromatic compounds. *Arch. Biochem.* 61 (1956) 431-441
- MIYAKE, Y., J.L. GAYLOR und H.S. MASON: Properties of a submicrosomal particle containing P-450 and flavoprotein. *J.biol.Chem.* 243 (1968) 5788-5797

- NEBERT, D.W., J.K. HELDEMA, H.W. STROBEL und M.J. COON:
Genetic expression of aryl hydrocarbon hydroxylase
induction. Genetic specificity resides in the frac-
tion containing cytochromes P₄₄₈ and P₄₅₀. J.biol.
Chem. 248 (1973) 7631-7636
- NIEDERMEIER, F.: Untersuchungen zum spektralen Verhalten
und zur enzymatischen Aktivität von Rattenlebermi-
krosomen nach Behandlung mit Nagarse. Med.Diss.
Mainz 1974
- NISHIBAYASHI, H., T. OMURA und R. SATO: A flavoprotein
oxidizing NADPH isolated from liver microsomes.
Biochim.biophys.Acta (Amst.) 67 (1963) 520-522
- NISHIBAYASHI, H. und R. SATO: Preparation of hepatic
microsomal particles containing P-450 as the sole
heme constituent and absolute spectra of P-450.
J.Biochem.(Tokyo) 63 (1968) 766-779
- OMURA, T. und R. SATO: A new cytochrome in liver microso-
mes. J.biol.Chem. 237 (1962) PC 1375-1376
- OMURA, T. und R. SATO: Fractional solubilization of
haemoproteins and partial purification of carbon
monoxide-binding cytochrome from liver microsomes.
Biochim.biophys.Acta 71 (1963) 224-226
- OMURA, T. und R. SATO: The carbon monoxide-binding pig-
ment of liver microsomes. I. Evidence for its hemo-
protein nature. J.biol.Chem. 239 (1964 a) 2370-2378
- OMURA, T. und R. SATO: The carbon monoxide-binding pig-
ment of liver microsomes. II. Solubilization, puri-
fication and properties. J.biol.Chem. 239 (1964 b)
2379-2385
- OMURA, T., R. SATO, T.Y. COOPER, O. ROSENTHAL und R.W.
ESTABROOK: Function of cytochrome P-450 of micro-
somes. Fed.Proc. 24 (1965) 1181-1189
- OZOLS, J.: Amino acid sequence of rabbit liver microsomal
cytochrome b₅. J.biol.Chem. 245 (1970) 4803-4874

- OZOLS, J.: Cytochrome b_5 from a normal human liver. J. biol.Chem. 247 (1972) 2242-2245
- OZOLS, J.: Cytochrome b_5 from microsomal membranes of equine, bovine, and porcine livers. Isolation and properties of preparations containing the membranous segment. Biochemistry(Wash.) 13 (1974) 426-434
- PETERSON, J.A.: Camphor binding by Pseudomonas putida cytochrome P-450. Arch.Biochem. 144 (1971) 678-693
- PHILLIPS, A.H. und R.G. LANGDON: Hepatic triphosphopyridine nucleotide-cytochrome c reductase: isolation, characterization, and kinetic studies. J.biol.Chem. 237 (1962) 2652-2660
- RAMSEYER, J. und B.w. HARDING: Solubilization and properties of bovine adrenal cortical cytochrome P-450 which cleaves the cholesterol side chain. Biochim. biophys.Acta(Amst.) 315 (1973) 306-316
- RAW, I. und H.B. MAHLER: Studies of electron transport enzymes. III. Cytochrome b_5 of pig liver mitochondria. J.biol.Chem. 234 (1959) 1867-1873
- REMMER, H.: Der beschleunigte Abbau von Pharmaka in den Lebermikrosomen unter dem Einfluß von Luminal. Naunyn Schmiedeberg's Arch.exp.Path.Pharmak. 235 (1959) 279-290
- REMMER, H. und H.J. MERKER: Enzyminduktion und Vermehrung von endoplasmatischem Retikulum in der Leberzelle während der Behandlung mit Phenobarbital (Luminal). Klin.Wschr. 41 (1963) 276-282
- REMMER, H., J.B. SCHENKMAN, R.W. ESTABROOK, H. SASAME, J. GILLETTE, D.Y. COOPER, S. NARASIMHULU und O. ROSENTHAL: Drug interaction with hepatic microsomal cytochrome. Molec.Pharmacol. 2 (1966) 187-190
- REMMER, H., J.B. SCHENKMAN und H. GREIM: Spectral investigations on cytochrome P-450, in: Microsomes and drug oxidations. Hrsg.v. J.R. GILLETTE, A.H. CONNEY, G.J. COSMIDES, R.W. ESTABROOK, J.R. FOUTS und G.J. MANNE-RING, New York, London 1969, S.371-386

- SARGENT, J.R., P.J.St. LOUIS und P.A. BLAIR: Isolation of NADH b₅ oxidoreduktase from rat liver microsomes. *Biochim.biophys.Acta (Amst.)* 233 (1970) 339-348
- SATO, R., H. SATAKE und Y. IMAI: Partial purification and some spectral properties of hepatic microsomal cytochrome P-450. *Drug Metab.Dispos.* 1 (1973) 6-13
- SCHENKMAN, J.B., H. GREIM, M. ZANGE und H. REMMER: On the problem of possible other forms of cytochrome P-450. *Biochim.biophys.Acta (Amst.)* 171 (1969) 23-31
- SCHENKMAN, J.B., H. REMMER und R.W. ESTABROOK: Spectral studies of drug interaction with hepatic microsomal cytochrome. *Molec.Pharmacol.* 3 (1967) 113-123
- SCHENKMAN, J.B. und R. SATO: The relationship between the pH-induced spectral change in ferriprothemo and the substrate-induced spectral change of the hepatic microsomal mixed-function oxidase. *Molec.Pharmacol.* 4 (1968) 613-620
- SCHLEYER, H., D.Y. COOPER und O. ROSENTHAL: Preparation of the heme protein P-450 from the adrenal cortex and some of its properties. *J.biol.Chem.* 247 (1972) 6103-6110
- SHIKITA, M., P.F. HALL und S. ISAKA: Purification of cytochrome P-450 from bovine adrenocortical mitochondria. *Biochem.biophys.Res.Comm.* 50 (1973) 289-293
- SHOEMAN, D.W., M.D. CHAPLIN und G.J. MANNERING: Induction of drug metabolism. III. Further evidence for the formation of a new P-450 hemoprotein after treatment of rats with 3-methylcholanthrene. *Molec.Pharmacol.* 5 (1969) 412-419
- SLADEK, N.E. und G.J. MANNERING: Evidence for a new P-450 hemoprotein in hepatic microsomes from methylcholanthrene-treated rats. *Biochem.biophys.Res. Commun.* 24 (1966) 668-674

- SOLIMAN, M.R.I., H.D. JOHNSON und A.E. WADE: The interactions of inducers, inhibitors, and substrates of drug-metabolizing enzymes with rat liver cytochrome P-450. *Drug Metab.Dispos.* 2 (1974) 87-96
- SPATZ, L. und P. STRITTMATTER: A form of reduced nicotinamide adenine nucleotide-cytochrome b_5 reductase containing both the catalytic site and an additional hydrophobic membrane-binding segment. *J.biol.Chem.* 248 (1973) 793-799
- STERN, J.O., J. PEISACH, W.E. BLUMBERG, A.Y.H. LU und W. LEVIN: A low temperature EPR study of partially purified, soluble ferric cytochromes P-450 and P-448 from rat liver microsomes. *Arch.Biochem.* 156 (1973) 404-413
- STRITTMATTER, C.F. und E.G. BALL: The intracellular distribution of cytochrome components and of oxidative enzyme activity in rat liver. *J.cell.comp. Physiol.* 43 (1954) 57-78
- STRITTMATTER, P.: The interaction of nucleotides with microsomal cytochrome reductase. *J.biol.Chem.* 233 (1958) 748-753
- STRITTMATTER, P.: The characterization and interconversions of two conformational states of cytochrome b_5 reductase. *J.biol.Chem.* 246 (1971) 1017-1024
- STRITTMATTER, P., R.E. BARRY und D. CORCORAN: Tryptic conversion of cytochrome b_5 reductase to an active derivate containing two peptide chains. *J.biol.Chem.* 247 (1972) 2768-2775
- STRITTMATTER, P. und S.F. VELICK: The isolation and properties of microsomal cytochrome. *J.biol.Chem.* 221 (1956) 253-264
- STRITTMATTER, P. und S.F. VELICK: The purification and properties of microsomal cytochrome reductase. *J.biol.Chem.* 228 (1957) 785-799

- STROBEL, H.W., A.Y.H. LU, J.K. HEIDEMA und M.J. COON: Phosphatidylcholine requirement in the enzymatic reduction of hemoprotein P-450 and in fatty acid, hydrocarbon, and drug hydroxylation. J.biol.Chem. 245 (1970) 4851-4854
- SYMMS, R.G. und M.R. JUCHAU: Stabilization, solubilization, partial purification and some properties of cytochrome P-450 present in CaCl_2 -precipitated human placental microsomes. Life Sci. 13 (1973) 1221-1230
- TAKEJUE, S. und T. OMURA: Purification and properties of NADH-cytochrome b_5 reductase solubilized by lysosomes from rat liver microsomes. J.Biochem. (Tokyo) 67 (1970) 267-276
- TAKEJUE, T. und R. SAFO: Enzyme distribution in subcellular fractions of intestinal mucosa cells. J.Biochem.(Tokyo) 64 (1968) 873-883
- TSAI, R.L., I.C. GUNBALUS und K. DUS: Composition and structure of camphor hydroxylase components and homology between putidaredoxin and adrenodoxin. Biochem.biophys.res.Comm. 45 (1971) 1300-1306
- VORE, M., J.G. HAMILTON und A.Y.H. LU: Organic solvent extraction of liver microsomal lipid. I. The requirement of lipid for 3,4-benzpyrene hydroxylation. Biochem.biophys.Res.Comm. 56 (1974) 1038-1044
- WELTON, A.F. und S.D. AUST: Multiplicity of cytochrome P_{450} hemoproteins in rat liver microsomes. Biochem. biophys.Res.Comm. 56 (1974) 898-906
- WEST, J.B. und A.Y.H. LU: Reconstituted liver microsomal enzyme system that hydroxylates drugs, other foreign compounds, and endogenous substrates. V. Competition between cytochromes P-450 and P-448 for reductase in 3,4-benzpyrene hydroxylation. Arch.Biochem. 155 (1972) 298-303

- WILLIAMS, C.H.Jr. und H. KAMIN: Microsomal triphosphopyridine nucleotide-cytochrome c reductase of liver. J.biol.Chem. 237 (1962) 587-595
- YONG, F.C., T.E. KING, S. OLDHAM, M.R. WATERMAN und H.S. MASON: Redox-dependent conformational changes of rabbit liver cytochrome P-450. Arch.Biochem. 138 (1970) 96-100
- YORO, T. und S. HORIE: Subcellular distribution of P-450 in bovine corpus luteum. J.Biochem.(Tokyo) 61 (1967) 515-517
- YU, C. und I.C. GUNSALUS: Crystalline cytochrome P-450_{cam}. Biochem.biophys.Res.Comm. 40 (1970) 1431-1436

LEBENS LAUF

Am 14. November 1951 wurde ich als Sohn des Postbetriebsassistenten Helmut Schneider und seiner Ehefrau Loni, geb. Rieth, in Niederbrombach geboren. Vom Frühjahr 1958 bis 1962 besuchte ich die Volksschule in Niederbrombach und trat dann in das Staatliche Neusprachliche und Mathematisch-Naturwissenschaftliche Gymnasium in Birkenfeld/Nahe ein. Dort bestand ich am 10.6.1970 die Reifeprüfung.

Seit dem Wintersemester 1970/71 studiere ich Medizin an der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz, wo ich am 7. Oktober 1971 die Naturwissenschaftliche Vorprüfung und am 27. März 1973 die Ärztliche Vorprüfung bestand. Das medizinische Staatsexamen werde ich voraussichtlich im Frühjahr 1976 ablegen.

Die Untersuchungen zum Thema dieser Arbeit begann ich im Februar 1974 am Pharmakologischen Institut der Universität Mainz.

